

## 緊急時における化学物質調査手法の検討

佐貫典子・岩本健也・七里将一・古角恵美・宮下康雄・藤原直樹・田村隆真<sup>1)</sup>・萩原裕規<sup>2)</sup>  
河原 晶<sup>3)</sup>・田中節彦<sup>4)</sup>・井上 健<sup>5)</sup>・池田将平<sup>4)</sup>・大柳まどか<sup>6)</sup>・古田世子<sup>7)</sup>・居川俊弘<sup>7)</sup>

### 要約

地震や風水害などの自然災害や人為的ミス等により化学物質の漏洩や流出が起こった緊急時においては、速やかに原因物質の究明や影響把握に役立つ調査手法を確立する必要がある。この手法として、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)および液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)による物質同定・簡易定量手法の検討および安全性確認のための魚類を用いた急性毒性試験による調査手法の検討を行った。

機器分析による調査手法の検討において、GC/MSでは、国立環境研究所(国環研)と地方環境研究所(地環研)とのII型共同研究に参画し、国環研が主導で構築している全自動同定定量システム(AIQS)の活用を検討した。LC/MSでは、第五期中期計画で確立した分析方法を用いて、緊急時への適用に向けた検討を行うとともに、分析時間短縮のための分析方法の改良および分析対象物質の追加検討を行った。

魚類を用いた急性毒性試験による調査手法の検討においても、II型共同研究に参画し、急性毒性試験に関する情報収集やゼブラフィッシュを用いた試験による試験精度の確認を行った。併せて、環境基準項目物質を用いて、魚種や魚の成長度合い等による急性毒性試験結果の差異を収集するとともに、緊急時に柔軟な対応が行えるように、急性毒性試験の早期判定の検討とオオミジンコによる遊泳阻害試験の導入検討も行った。

これらのように、第六期中期計画においては、II型共同研究を核とし、機器分析と生物(魚類)を用いた緊急時の調査方法の検討に取り組んだ。

### 1. はじめに

近年、自然災害、特に豪雨災害が頻繁におこり、その規模や範囲が大きくなってきている<sup>1)</sup>。ひとたび災害が発生すると建物の倒壊や浸水、事故等により化学物質が流出し、自然環境や社会生活に大きな影響を与える可能性がある。化学物質の漏洩や流出が起こった場合には、原因物質の影響を把握し、汚染範囲を早期に確定するためにも速やかな原因物質の特定究明が望まれる。対応が遅れると二次災害のリスクも増え、被害拡大につながることも懸念される。平常時とは異なり、いつ起こるかかわからない緊急時に対してのリスク管理のために万全な備えが必要となってくる。

一方、環境法令による規制や工場・事業場の自主的取組み等により、平常時における環境汚染物質の排出量は減少傾向にある。しかし、化学物質の流出等による水質苦情件数は、滋賀県においても一定数発生しており(図1)<sup>2)</sup>、原因となりうる化学物質は化学物質排出把握管理促進法(PRTR法)の第一種指定化学物質だけでも515種にわたっている<sup>3)</sup>。

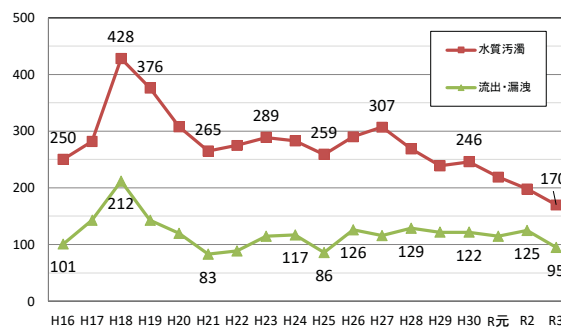


図1 県内の苦情発生件数

当センターでは、緊急時に幅広く対応できるように、原因物質究明のための機器分析と、機器分析では原因物質の把握が困難な場合や複合的な影響を確認するための生物応答試験を併用した調査手法の体制を整えることとした。

機器分析では、緊急時には多種類の化学物質が流出する可能性があるため、化学物質の性質に適した測定機器が必要となる。そこで、GC/MSとLC/MSを用いて「機器分析による化学物質の緊急時調査手法の検討」を行った。また、生物応答試験では、周辺環境への安全性の確認等のために

1) 現・南部環境事務所 2) 現・琵琶湖環境部循環社会推進課 3) 現・衛生科学センター 4) 現・甲賀環境事務所 5) 現・東近江環境事務所  
6) 現・琵琶湖環境部環境政策課 7) 元・琵琶湖環境科学研究センター

「魚類を用いた急性毒性試験による調査手法の検討」を行ったので、各テーマにおける研究結果を報告する。

## 2. 機器分析による化学物質の緊急時調査手法の検討

災害や事故等の緊急時の取組について、国環研では、緊急時における化学物質の環境調査を重要視し、災害環境研究という分野を立ち上げた<sup>4)</sup>。その中の1つとして、地環研とのⅡ型共同研究において、災害時に流出等が懸念される物質の迅速測定法である全自動同定定量システム(AIQS-GC)を構築し、最終400物質の測定を可能にすることを目的とした「災害時の研究に調査を想定したGC/MSによる化学物質の網羅的簡易迅速測定法の開発」を平成31(2019)年度から実施している(令和2(2020)年度まで)<sup>5)</sup>。令和4(2022)年度からは「災害時等における化学物質の網羅的簡易迅速測定法を活用した緊急調査プロトコルの開発」として、約1000物質の測定が可能なAIQS-GCの構築と地環研への実践的な普及を目的に実施されている<sup>6)</sup>。

本県も当初からこのⅡ型共同研究に参画することにより、迅速に分析可能な物質を大きく増やすことができると期待される。そのため、多成分の化学物質の測定や多くの情報量の取得が可能となるAIQS-GCを用いた検討を行うこととした(図2-1)。



図2-1 分析に用いたGC/MS

一方、機器分析では物性によって適正な機器が異なることから、GC/MSでは測定困難な揮発性の低い物質や熱分解性が高い物質については、LC/MSを用いた検討を進めてきた。

LC/MSの検討では、第五期中期計画においてPRTR法に基づく化学物質の移動排出量のデータをもとに物質を選択し、簡易な前処理(測定試料の調製)のみで分析が可能で一斉分析法を確立した<sup>7)</sup>。今回は、この分析方法を用いて、緊急時への適用に向けた検討を行うとともに、分析時間の短縮化および分析対象物質の追加の検討を行った。

化学物質に係る緊急時の対応として、機器分析による迅速な物質同定と簡易定量の検討を行ったので、その結果を

報告する。

### 2.1. GC/MSを用いた分析検討

緊急時には、定期的に監視している環境基準項目など基準が定められた規制物質だけを測定するだけでは原因物質を把握することは難しい。これまで、原因物質がある程度特定された場合は、想定した物質の分析は行うことができたが、多種多様な化学物質が想定される緊急時には、環境中の化学物質の状況を網羅的に把握するために、化学物質を迅速に測定可能なスクリーニング分析法(AIQS-GC)が必要となる。

#### 2.1.1. AIQS-GC

AIQSとは、国環研主導のもとで構築された迅速スクリーニング分析法である。AIQSのデータベースには約1000物質の検量線情報が入っているため、物質同定と簡易定量が可能となり、標準溶液の確保や検量線作成が不要となる(図2-2)。

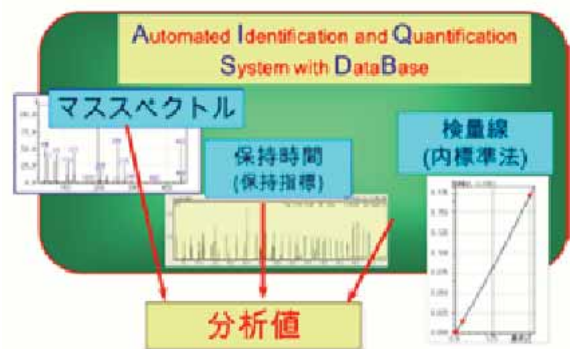


図2-2 AIQS-DBの概念図<sup>8)</sup>

通常、GC/MSを用いて分析する場合、測定したい物質の標準溶液を入手し、標準溶液の調整を行う。次に測定条件の設定、測定対象物のマススペクトルの確認や保持時間の確認を行い、検量線を作成する。検量線は、機器の調整により変動するため測定毎に作成する必要がある。このため、従来の方で約1000物質の測定をするためには、約1000物質の標準溶液の確保、測定条件の設定や検量線作成等、膨大な時間と予算が必要となる。

そこで、緊急時にAIQS-GCを用いることにより、迅速な原因究明に繋げることが期待できる。なお、今回は、半揮発性物質を対象としたGC/MS版のAIQS-GCを用いる。

## 2.1.2. AIQS 分析

AIQS-GC の分析の流れは図 2-3 のとおりである。

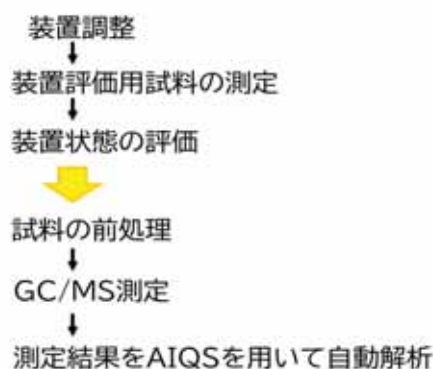


図 2-3 AIQS-GC 分析の流れ

AIQS を用いて分析するためには、GC/MS の装置状態を AIQS のデータベース作成時と同等の状態にする必要がある。そのため、試料の測定前に使用する GC/MS の装置調整と装置状態の評価を行い、評価結果が所定の基準を満たすことを確認する必要がある。

評価結果が所定の基準を満たすことを確認後、試料の前処理、GC/MS による測定、AIQS を用いた解析を行う。

### 2.1.2.1. 装置調整・評価

異なるメーカーや機種において同様の測定結果を得るためにも、GC/MS の同一測定条件を設定し、試料測定前に装置調整・評価を行う必要がある。

GC/MS の装置状態の確認は、試料測定前に評価用試料（クライテリアサンプル。以下「クライテリア」という。）を測定し、所定の基準を満たしているかを確認する。基準を満たしていない場合は、再度、ライナーやセプタムの交換等のメンテナンス等により装置調整を行う。

#### 2.1.2.1.1. 方法

カラムと測定条件を表 2-1 のとおり設定した。

使用した試薬および GC/MS の条件を以下に示す。

[使用試薬等]

クライテリア：林純薬工業製 AIQS/NAGINATA クライテリア MixIII 標準品

ジクロロメタン他溶媒：富士フィルム和光純薬製 残留農薬試験用（5000 倍濃縮）

[GC/MS の装置]

GC：Thermo Fisher Scientific Trace1310

MS：Thermo Fisher Scientific TSQ 8000Evo

表 2-1 GC/MS 測定条件

使用カラム	J&W DB-5MS (5%フェニルメチルシリコン系キャピラリーカラム)		
注入モード	スプリットレス(ウール無し)		
イオン化法	EI		
サンプリング時間	1分		
キャリアーガス	He		
チューニングメソッド	DFTPPチューン		
チューニングマス	1	69	
	2	219	
ターゲットマス(69=100%)	3	502	
	m/z	%	
	50	1	
	131	45	
	219	55	
温度プログラム	カラムオープン温度：40°C(2分間)→8°C/分で昇温→310°C(5分間)		
	気化室温度 250°C		
インターフェース温度	280°C		
イオン源温度	230°C		
四重極温度	150°C		
制御モード	コンスタントフロー		
スキャン質量範囲	33~600		
インターバル (サイクルタイム)	0.3-0.4秒 (細かい時間は設定できない)		
注入量	1μL		

クライテリアには、主に GC/MS の注入口、カラムおよび検出器の劣化や不具合の指標となる化学物質 21 物質（表 2-2）が選定されており、個々の化合物の測定感度、ピーク形状の確認、テーリング度、測定時間、測定値の強度の変化等を数値化し、装置状態の確認を行うものである。

### 2.1.2.1.2. 結果と考察

クライテリアを測定した結果を表 2-2 に示す。評価基準を満たしている場合は PASS と表示されるが、一部、評価基準を満たさない物質が確認された。装置やカラム等の汚れや劣化が原因と推定され、再度装置のメンテナンスと共に装置条件の最適化が必要であることがわかった。

表 2-2 AIQS クライテリアテスト結果画面（1 例）

解析結果	項目	結果
解析結果	注入口・ライナー	
	イソブチオン	PASS
	カドミウム	RF
	カラム (注入口側)	
	2,4-ジクロロベンゼン	PASS
	シマジン	PASS
	ベンジカロフェニール	PASS
	2,4-ジニトロベンゼン	PASS
	カラム (MS側)	
	フェニトチン	PASS
	イオン源	
	その他 (感度等)	
2,6-ジメチルピリジン	PASS	
2,6-ジクロロフェノール	PASS	
ベンジチアゾール	PASS	
フタル酸ジエチル	PASS	
リジン トリプル	RF	
フタル酸ジメチル	RF	
保持時間		
カドミウム	PASS	
内部標準物質		
4-クロロベンゼン-d4	PASS	
1,4-ジクロロベンゼン-d4	PASS	
ナフタレン-d8	PASS	
アセチレン-d10	PASS	
フェニトリン-d10	PASS	
フルオロベンゼン-d10	PASS	
フルオロベンゼン-d12	PASS	

System Performance Report - Detail : Q/T Ratio									
解析日時	2023/9/27 8:56								
データファイル名	C:\Users\k滋賀県琵琶湖環境科学研究所\Desktop\II型データ (ANEL) ¥2023¥2023092								
予想保持時間	リテンションインテックス								
ID	化合物名	定量イオン	Q/T Ratio Check						
			定量値 (ppm)		Q/T比率 (%)		判定		
			測定	下限値	上限値	測定		基準値	許容範囲
N1	4-クロロフェニール	95	1.000			38.0	32.0		---
N7	1,4-ジクロロベンゼン-d4	150	1.000			64.0	63.0		---
N29	2,6-ジメチルピリジン	121	0.754	0.700	1.300	98.0	90.0		---
N31	ナフタレン-d8	136	1.000			9.0	10.0		---
N33	2,6-ジクロロフェニール	162	0.873	0.700	1.300	66.0	63.0		---
N39	ベンゾチアゾール	135	0.969	0.700	1.300	26.0	33.0		
N65	2,4-ジクロロピリジン	161	1.226	0.700		61.0	64.0		
N82	アセチルピリジン-d10	164	1.000			105.0	93.0		---
N95	フタル酸ジエチル	149	0.854	0.700	1.300	20.0	22.0		
N106	リン酸 トリブチル	99	0.437	0.700	1.300	29.0	18.0		x
N149	シマジン	201	0.846	0.700		74.0	64.0		
N109	ベンゾチアゾール	266	0.866	0.500		62.0	62.0		
N160	フェニトリン-d10	188	1.000			16.0	10.0		---
N185	クロルピリスチル	286	1.391			71.0	69.0		---
N289	フェニトリン	277	0.719	0.700		101.0	70.0		
N290	2,4-ジニトロピリジン	183	0.834			95.0	58.0		---
N322	アセチルピリジン-d10	212	1.000			11.0	18.0		---
N374	イキチオン	177	1.201	0.700		26.0	31.0		
N228	フタル酸ジメチル	149	0.494	0.700	1.300	19.0	21.0		x
N239	ナフタレン	79	0.569	0.700		10.0	8.0		x
N247	カレベン-d12	240	1.000			9.0	15.0		---

### 2.1.2.2. 装置調整の検討

再度装置メンテナンスを行ったが、評価基準を満たすことができなかつたため、装置条件の検討を行った。定量値が評価基準の下限値よりも低かつたため、対象物質の装置内での吸着が原因と考え、シリンジの長さの変更を検討した。また、農薬分析時に用いられ、GCシステム内の活性点と分析対象成分の吸着や分解を減少させる化合物であるアナライトプロテクタント (AP) の添加による検討を行った<sup>9)</sup>。

#### 2.1.2.2.1. 方法

できるだけ注入口の底部であるカラムの入り口付近にサンプルを注入できるように、シリンジの長さを、通常使用している 57 mmシリンジより長い 85 mmシリンジに変更した (図 2-4)。また、装置内の吸着を減らすために、クライテリア測定前に AP の一つである飽和脂肪酸混合標準溶液の注入を行った。



図 2-4 シリンジツール (右 : 57 mm (標準)、左 : 85 mm)

#### 2.1.2.2.2. 結果と考察

検討結果を図 2-5 に示す。

シリンジの変更により、これまで評価基準を満たしていなかつたリン酸トリブチルについて効果的であり、評価基準を全て満たすことができた。また、飽和脂肪酸混合標準溶液をクライテリア測定前に注入した場合のみでも、シリンジの変更時と同様な結果であつた。そのため、通常業務で簡易に実施可能である飽和脂肪酸混合標準溶液を測定前に注入することとした。

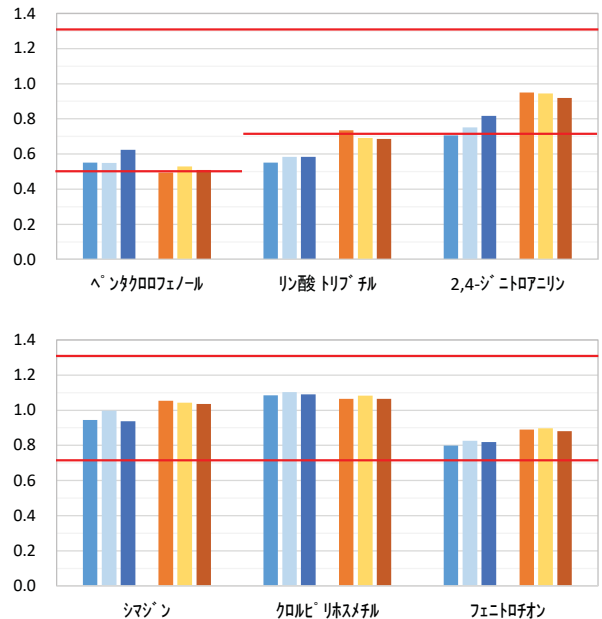


図 2-5 シリンジ変更検討結果 (n=3)

(左 : 57 mm、右 : 85 mm、  
太線 : 基準上限値、下限値)

#### 2.1.2.3. 試料の前処理方法の検討

AIQS の測定試料の前処理方法として、固相抽出方法 (図 2-6) と液液抽出方法 (図 2-7) が指定されている<sup>11)</sup>。両方法を用いて、測定、解析結果の差異について比較確認を行った。



図 2-6 固相抽出法による分析法チャート

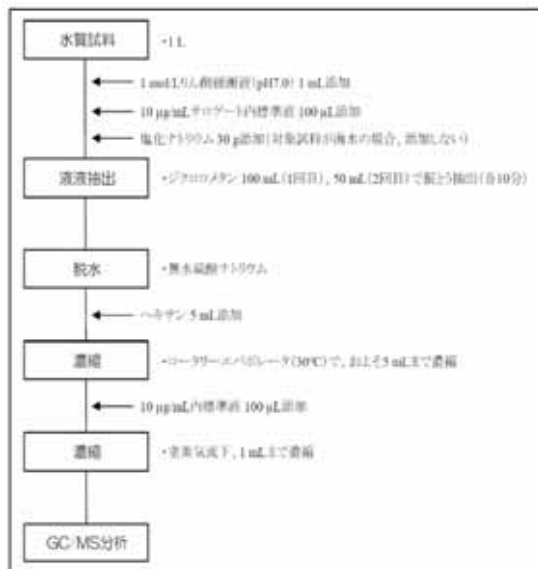


図 2-7 液液抽出法による分析法フローチャート

### 2.1.2.3.1. 方法

ブランク水 (BL) と環境水について、固相抽出装置 (図 2-8) を用いた固相抽出法および液液抽出法でそれぞれ前処理を行い、測定を行った。



図 2-8 固相抽出装置

### 2.1.2.3.2. 結果と考察

解析結果を表 2-3 に示す。下限値は 0.02mg/L とし、下限値以上検出された値は検出として「○」と表記した。固相抽出法で調整した場合、液液抽出法と比較して環境水で検出された物質は多かったが、ブランク水で検出された物質も多かった。環境水からブランクを差し引いた数値(差)では不検出となる物質もあり、半定量のスクリーニング分析であることを考えると全体としては、検出結果に大差がないと考えた。今後は、簡易な固相抽出法で前処理を行うこととした。

表 2-3 解析結果 (抜粋)

化合物名	液液抽出法			固相抽出法		
	BL	環境水	差	BL	環境水	差
Acetophenone	○	○		○	○	
Benzothiazole	○	○		○	○	
Bis(2-ethylhexyl)phthalate	○	○		○	○	○
Bromobutide					○	○
Caffeine+		○	○			
DCIP	○			○		
Dibutyl phthalate		○	○		○	○
Diisobutyl phthalate (DIBP)					○	○
n-C10H22(Decane)				○	○	
n-C11H24(Undecane)	○	○	○	○	○	
n-C12H26(Dodecane)				○	○	
n-C13H28(Tridecane)				○	○	
n-C14H30(Tetradecane)				○	○	
n-C16H34(Hexadecane)				○	○	
n-C17H36(Heptadecane)		○	○			
n-C18H38(Octadecane)				○	○	
n-C29H60(Nonacosane)	○	○				
n-C30H62(Triacontane)	○	○				
n-C31H64(Hentriacontane)	○	○		○	○	
Squalane+	○	○	○	○	○	○
Triadimenol @1	○	○		○		

### 2.1.3. II 型共同研究への参画

II 型共同研究をとおして、AIQS-GC の開発、参加機関への普及が図られている。一方、装置非依存型であることから、汎用化の過程で、データベースにおける保持指標 (RI) のずれの補正が課題として挙げられた。また、AIQS の活用にあたっては、解析方法の習得も必要であるため、本県も

II型共同研究に参画し、データベースの最適化への貢献や実践的な活用に向けて解析演習への参加を行ったことから、その内容について報告する。

### 2.1.3.1. AIQS-DBの最適化

RIとは、n-アルカンのRI（炭素数nの100倍）と溶出位置（溶出時間：RT）との関係から、測定試料のRIを溶出時間から算出したものであり、物質同定に必要な項目の一つである。

RIは物質同定に大きく影響するが溶出時間によって値が異なる。RI値のズレの補正を行うために、同一のGC/MS測定条件にて、参加機関が分担して、溶出時間を再測定することとなった。

RIを求めるために必要な溶出時間は、標準溶液を測定して求められるため、参加機関が保有している標準溶液を各々測定し、その結果を国環研に報告した。当所が報告した結果は表2-4のとおりである。

表2-4 標準溶液測定結果

物質名	RT	RI
2,4-ジクロロフェノール	11.7	1164.7
2-フェノキシエタノール	12.7	1216.2
4-tert-ブチルフェノール	14.0	1288.2
4-n-オクチルフェノール	21.3	1766.3
4-tert-オクチルフェノール	19.0	1599.2
m-アミノフェノール	13.8	1276.2
アセフェート	16.3	1428.5
アニリン	7.8	974.4
ジフェニルアミン	19.3	1622.1
パラチオン	24.2	1984.7
パラチオンメチル	22.9	1885.8
ビスフェノールA	26.3	2166.7
フェノール	7.8	974.4

### 2.1.3.2. 解析演習への参加

AIQSで使用する共通解析ソフトは、各メーカーのデータを読み込める解析ソフトである。解析は自動で行われるが、その後、手動でマススペクトル等の情報から物質同定の確認作業をする必要がある。このソフトを用いて共通解析ファイルを解析する研修に参加し解析方法の習得を行った。

解析の注意点として、予想RTが同じ物質は、減算スペクトルに全て合算して表示されるのでラブラリースペクトルとはパターンが変わってくる可能性があるため一致率が低くなる可能性がある等の説明を受けるなど解析方法の習熟に繋がった。

## 2.2. LC/MSを用いた分析検討

第五期中期計画ではPRTR法に基づく化学物質の移動排出量のデータをもとに、全国および滋賀県内で流出のリスクが高いと考えられる物質を抽出し、簡易な前処理（測定試料の調製）のみで分析が可能な一斉分析法を確立した（図2-9）。

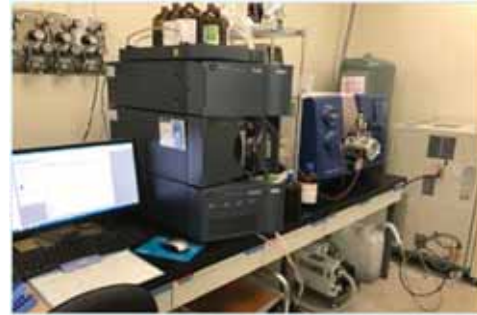


図2-9 分析に用いたLC/MS

緊急時は平常時とは異なり、濁りが多いことも想定されることから、第五期中期計画で確立した方法を用いて、これまでに検討した平常時の環境水とは異なる模擬濁水について検討を行った。また、緊急時では迅速かつ多種多様な化学物質の分析が望まれる。確立した分析方法について、分析時間の短縮化の検討を行うとともに、検討した分析方法を用いて、分析対象物質の追加検討を行った。

### 2.2.1. 模擬濁水を用いた検討

緊急時における環境水の濁りを想定し、試料水に河川の泥と琵琶湖の泥を用いて濁度等を変えて模擬濁水を調製し、添加回収試験により第五期中期計画で確立した分析方法が濁水でも適用可能かの検討を行った。

添加回収試験の測定対象物質は、イオン化モードで区分し、ESI-Negative（ネガティブモード）グループ（7物質）とESI-Positive（ポジティブモード）グループ（13物質）に分けて表2-5に示す20物質とした。

表2-5 測定物質

ネガティブモード	ポジティブモード
直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩 (LAS:C10~14)	アニリン
4-ヒドロキシ安息香酸メチル(MP)	アクリルアミド
4-n-オクチルフェノール(OP)	ヘキサメチレンテトラミン
4-tert-ブチルフェノール(4-t-BP)	N,N-ジメチルアセトアミド
2,4-di-tert-ブチルフェノール(2,4di-t-BP)	チオ尿素
ビスフェノールA(BPA)	4,4'-メチレンジアニリン
4-n-ノニルフェノール(n-NP)	4,4'-ジアミノジフェニルエーテル
	ジフェニルアミン
	ベンゾフェノン
	ビス(1-(4-フル-1-フェニル)エチル)エーテル
	m-アミノフェノール
	2-イミダゾリジンチオン
	ポリ(オキシエチレン)ノニルフェニルエーテル

### 2.2.1.1. 模擬濁水調製方法

模擬濁水は、琵琶湖と河川で採水した試料に、底泥を加え、種類と濁度が異なる模擬濁水を作成した。表 2-6 のとおり、琵琶湖濁水①（濁度約 50・SS 約 200）、同②（濁度約 100・SS 約 800）、同③（濁度 100 以上・SS1000 以上）、河川濁水（濁度約 100・SS 約 600）の 4 種類とした。

表 2-6 模擬濁水試料

琵琶湖濁水①	濁度約50・SS約200
琵琶湖濁水②	濁度約100・SS約800
琵琶湖濁水③	濁度100以上・SS1000以上
河川濁水	濁度約100・SS約600

### 2.2.1.2. 分析方法

試料の調製は、緊急事故時には迅速な分析として、第五期中期計画で確立した方法に従い、フィルターを用いたろ過操作のみとした。

最初に、試料水に等量のメタノールを加えて、試料の 50%メタノール溶液（調製試料）を調製する。次にメタノール洗浄したガラス製シリンジにフィルターを取り付け、50%メタノール水溶液 2mL でフィルターを洗浄する。調製試料 1mL をろ過後、フィルターを 50%メタノール水溶液 1mL で洗浄し、それを調製試料に加えて測定試料とした（図 2-10）。

測定物質（表 2-5）の検量線標準液 2.5~40μg/L を調製し、測定した。あわせて添加回収試験を行った（最終濃度 10μg/L）。

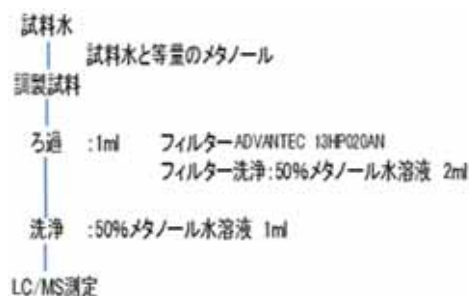


図 2-10 試料調製方法

使用した試薬および LC/MS の条件を以下に示す。（表 2-7、2-8）

〔使用試薬等〕

- メタノール：富士フィルム和光純薬製 LC/MS 用
- アセトン：富士フィルム和光純薬製残留農薬試験用
- フィルター：ADVANTEC 社製 13HP020AN

〔LC/MS 測定条件〕

LC：Waters Acquity UPLC H-Class  
MS：AB SCIEX TRIPLE QUAD 4500

表 2-7 ネガティブモード測定条件

カラム	YMC製 Triart C18 (2.0 x 100mm, 1.9μm)
移動相	A:超純水 B:メタノール
<b>LC条件</b>	
グラジエント条件	0→9min A:50→5%、B:50→95% 9→14min A:B=5:95 14→20min A:B=50:50
<b>MS条件</b>	
カラム流量	0.3mL/min
カラム温度	40°C
注入量	5 μL
イオン化法	ESI-Negative
Curtain Gas	20psi
Collision Gas	7
IonSpray Voltage	-3500
Desolvation Temperature	600°C

表 2-8 ポジティブモード測定条件

カラム	Waters製 HSS T3 (2.1 x 100mm, 1.8μm)
移動相	A:超純水 B:メタノール C:100mM酢酸アンモニウム
<b>LC条件</b>	
グラジエント条件	0 → 12min A:B:C=85.5:5:9.5 12→15min A:85.5→31.5%、B:5→65%、C:9.5→3.5% 15→24min A:B:C=31.5:65:3.5 24→35min A:B:C=4.5:95:0.5 35→45min A:B:C=85.5:5:9.5
カラム流量	0.25mL/min
カラム温度	40°C
注入量	5 μL
<b>MS条件</b>	
イオン化法	ESI-Positive
Curtain Gas	30psi
Collision Gas	8
IonSpray Voltage	5500V
Desolvation Temperature	500°C

### 2.2.1.3. 結果と考察

模擬濁水での添加回収試験結果を表 2-9 に示す。ネガティブモードグループの回収率は 66~138%と良好な結果が得られた。

ポジティブモードグループの回収率についても、2 物質を除いては 65~122%と良好であった。

なお、2 物質のうち、4,4'-ジアミノジフェニルエーテルは琵琶湖濁水③で、NPE はエチレンオキシドの付加モル数が増える NPE8 以降で回収率が低くなったが、緊急時のスクリーニング分析としては概ね適用可能であることを確認した。

表 2-9 模擬濁水の添加回収試験結果

物質名		琵琶湖濁水① (%)	琵琶湖濁水② (%)	琵琶湖濁水③ (%)	河川濁水 (%)		
ESI-Negative	LAS	C10	94 ~ 104	97 ~ 104	94 ~ 109	96 ~ 114	
		C11	102 ~ 114	101 ~ 109	93 ~ 113	100 ~ 124	
		C12	94 ~ 106	93 ~ 103	94 ~ 106	95 ~ 118	
		C13	95 ~ 97	89 ~ 98	77 ~ 90	87 ~ 104	
		C14	81 ~ 88	82 ~ 88	78 ~ 82	83 ~ 97	
	4-ヒドロキシ安息香酸メチル(MP)		105 ~ 112	104 ~ 105	111 ~ 116	105 ~ 115	
	4-n-オクチルフェノール(OP)		131 ~ 135	114 ~ 132	126 ~ 138	106 ~ 136	
	4-tert-ブチルフェノール(4-t-BP)		101 ~ 117	111 ~ 122	116 ~ 138	110 ~ 127	
	2,4-di-tert-ブチルフェノール(2,4-di-t-BP)		78 ~ 90	72 ~ 76	66 ~ 74	69 ~ 82	
	ビスフェノールA(BPA)		89 ~ 98	95 ~ 100	90 ~ 103	99 ~ 110	
4-n-ノニルフェノール(n-NP)		113 ~ 125	112 ~ 126	119 ~ 122	98 ~ 115		
ESI-Positive	アニリン		79 ~ 93	89 ~ 104	95 ~ 101	88 ~ 108	
	アクリルアミド		105 ~ 112	105 ~ 110	111 ~ 118	103 ~ 113	
	ヘキサメチレンテトラミン(HMT)		80 ~ 91	82 ~ 97	80 ~ 93	85 ~ 104	
	N, N-ジメチルアセトアミド		92 ~ 113	93 ~ 101	112 ~ 121	96 ~ 102	
	チオ尿素		72 ~ 89	73 ~ 79	65 ~ 74	70 ~ 76	
	4, 4'-メチレンジアニリン		81 ~ 92	93 ~ 99	85 ~ 97	94 ~ 108	
	4, 4'-ジアミノジフェニルエーテル		92 ~ 96	84 ~ 97	29 ~ 70	96 ~ 104	
	ジフェニルアミン		83 ~ 98	84 ~ 103	97 ~ 113	78 ~ 102	
	ベンゾフェノン		89 ~ 92	95 ~ 105	93 ~ 105	94 ~ 103	
	ビス(1-メチル-1-フェニルエチル)エーテル(DCPO)		81 ~ 110	84 ~ 90	67 ~ 83	78 ~ 89	
	m-アミノフェノール		84 ~ 96	87 ~ 97	86 ~ 96	93 ~ 99	
	2-イミダゾリジンチオン		108 ~ 116	108 ~ 117	118 ~ 122	108 ~ 112	
	ポリ(オキシエチレン)ノニルフェニルエーテル	NPE2		94 ~ 99	89 ~ 117	111 ~ 117	84 ~ 94
		NPE3		95 ~ 109	113 ~ 125	97 ~ 123	95 ~ 129
		NPE4		89 ~ 108	84 ~ 102	107 ~ 136	97 ~ 110
		NPE5		91 ~ 104	87 ~ 115	107 ~ 124	91 ~ 94
		NPE6		98 ~ 122	106 ~ 116	111 ~ 120	94 ~ 112
		NPE7		83 ~ 116	103 ~ 118	74 ~ 88	73 ~ 94
		NPE8		78 ~ 91	79 ~ 90	59 ~ 61	47 ~ 66
		NPE9		91 ~ 99	82 ~ 102	33 ~ 46	40 ~ 54
NPE10		88 ~ 93	75 ~ 85	17 ~ 25	28 ~ 46		
NPE11		66 ~ 86	46 ~ 57	-7 ~ 2	12 ~ 29		
NPE12		59 ~ 80	36 ~ 48	-5 ~ 5	11 ~ 27		
NPE13		42 ~ 61	21 ~ 32	-8 ~ -2	2 ~ 13		
NPE14		19 ~ 44	6 ~ 18	-8 ~ -7	-5 ~ 5		
NPE15		8 ~ 25	-3 ~ 3	-8 ~ -8	-7 ~ -2		



## 2.2.2. 分析時間の短縮化の検討

第五期中期計画で確立した分析方法では、ポジティブモードグループとネガティブモードグループで測定条件(LC条件とMS条件)が異なり、特にLC条件が変更となる場合は、カラムの交換や安定化等に一定の時間を要する。このため、分析時間の短縮化の検討として、LC条件は同一で、MS条件をポジティブモードとネガティブモードに切り替えるスイッチング分析法を行った。

### 2.2.2.1. 方法

測定対象物質 20 物質(表 2-5)の検量線標準溶液 1~40  $\mu\text{g/L}$ を調製し、模擬濁水を測定した条件から、LC条件はポジティブモード測定条件(表 2-8)で、MS条件は各モードを切り替えながら測定した。

### 2.2.2.2. 結果と考察

測定対象物質のポジティブモード測定物質は、従来通りの測定条件と同じであるため、結果はネガティブモード測定物質のみを示す。

7 物質中 6 物質は検量線も概ね良好で、スクリーニング分析法が適用可能であることがわかった(図 2-11)。

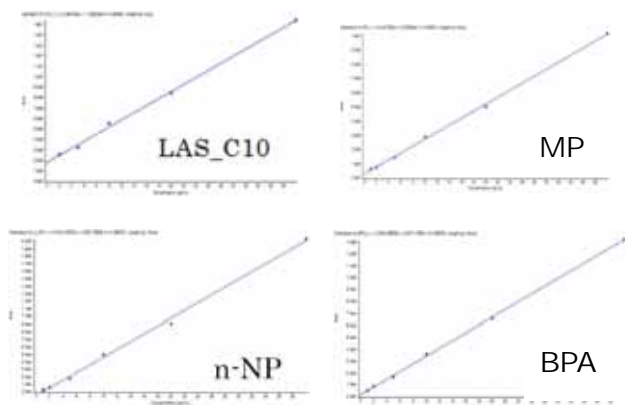
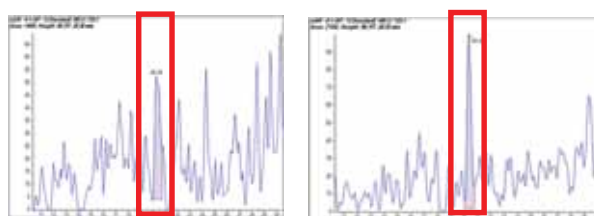


図 2-11 検量線(抜粋)

検量線の作成が不可能であった 4-t-ブチルフェノール(以下、「4-t-BP」という。)については、ネガティブモード測定条件と比較して、かなり感度が悪くなったが、40  $\mu\text{g/L}$ では検出されることが確認できたため、緊急時でのスクリーニング分析時においては、適用できる可能性があると考えた。以下にスイッチング分析法での 4-t-BP 標準溶液 20, 40  $\mu\text{g/L}$ のクロマトグラムの結果を示す(図 2-12)。



4-t-BP 20  $\mu\text{g/L}$

4-t-BP 40  $\mu\text{g/L}$

図 2-12 クロマトグラムの結果

## 2.2.3. 対象物質の追加検討

LC/MSで測定可能な物質は、GC/MSよりも前処理が簡便で迅速に結果が得られる利点があることから、測定対象物の追加検討を行った。PRTR対象物質の中から全国のPRTRデータで排出・移動量の実績があるハロ酢酸類と農薬類を対象とした。

### 2.2.3.1. ハロ酢酸類

新規追加項目としてハロ酢酸類(クロロ酢酸(MCAA)、ジクロロ酢酸(DCAA)、トリクロロ酢酸(TCAA))を選定した。これらの物質は、塩素消毒副生成物であり、また MCAA および TCAA は全国の PRTR データで排出・移動量の実績がある。

#### 2.2.3.1.1. 方法

分析時間短縮化で検討した測定条件(スイッチング分析法)で、検量線標準溶液 0.25~50  $\mu\text{g/L}$ を調製し、測定した。あわせて、添加回収試験を行った(最終濃度 10  $\mu\text{g/L}$ )。

#### 2.2.3.1.2. 結果と考察

標準溶液を測定した結果を図 2-13 に示す。検量線は、MCAA、DCAA は良好であったが、TCAA では、検量線の最小濃度が 10  $\mu\text{g/L}$ であり、ベースラインも高く、感度が悪かった。

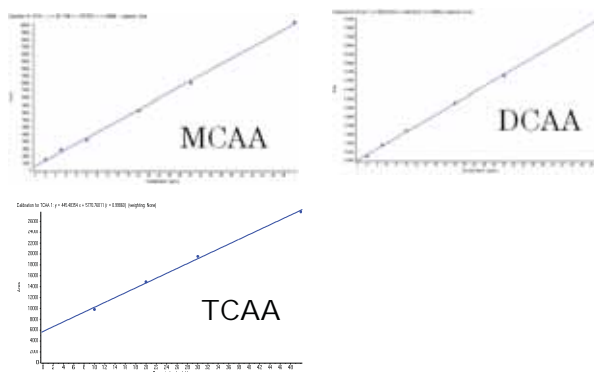


図 2-13 検量線

添加回収試験の結果は、表 2-10 に示す。MCAA は 200% を超えており、TCAA は、不検出であった。試料調製時に、フィルターへの吸着が考えられたことから、第五期中期計画で確立した試料調製方法は適用できないことがわかった。

表 2-10 添加回収試験結果

MCAA	DCAA	TCAA
209%	43%	0%

### 2.2.3.2. 水質管理目標設定物質

使用量、出荷量とも実績のある物質が含まれる水道法の水質管理目標設定項目物質を選定した。

#### 2.2.3.2.1. 方法

水質管理目標設定項目の混合標準液を用いて、91 物質の MS 条件を作成した(表 2-11、2-12)。検量線標準溶液 0.5 ~ 5 μg/L を調製し、測定した。あわせて添加回収試験を行った(最終濃度 2.5 μg/L)。

#### 2.2.3.2.2. 結果と考察

標準溶液を測定した結果、検量線は、チウラム以外の 90 物質は概ね良好な結果であった( $r^2=0.99$  以上が 85 物質)(図 2-14)。

添加回収試験の結果は、添加した 90 物質中 8 物質は回収率が 150%以上となったが、82 物質は 79~124%と良好な結果が得られた。

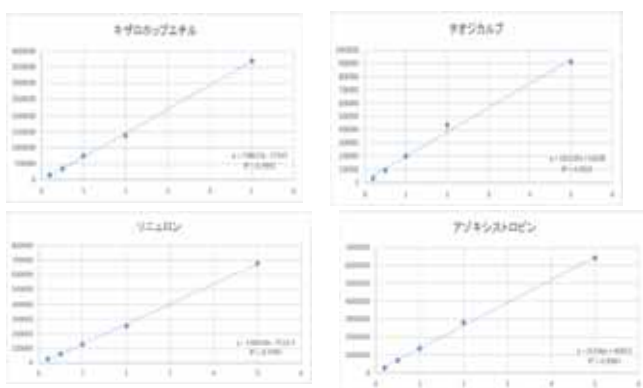


図 2-14 検量線(抜粋)

表 2-11 使用量・出荷量実績がある物質

物質名	回収率 (%)	測定質量数	
2,4-D	342	219	> 161
MCPA	266	199	> 141
アシュラム	113	231	> 156
アセタミプリド	114	223	> 126
アゾキシストロビン	121	404	> 372
イプロジオン	101	330	> 245
イミダクロプリド	111	256	> 209
インダノファン	88	341	> 175
エトベンザニド	113	340	> 179
オキサジクロメホン	113	376	> 190
オキサミル	88	237	> 72
キザロホップエチル	103	373	> 299
クミルロン	113	303	> 185
クロチアニジン	109	250	> 169
クロメプロップ	111	324	> 120
シアナジン	111	241	> 214
ジウロン(DCMU)	109	233	> 72
ジノテフラン	108	203	> 129
ジフェノコナゾール	104	406	> 251
シラフルオフェン	120	426	> 287
ダイムロン	114	269	> 151
チアジニル	124	266	> 71
チアメトキサム	79	292	> 181
チウラム	118	241	> 120
チオジカルブ	97	355	> 108
チフルザミド	107	527	> 125
テトラコナゾール	114	372	> 159
テブコナゾール	105	308	> 70
テブフェノジド	135	353	> 133
トリクロピル	212	254	> 196
トリシクラゾール	111	190	> 136
ハロスルフロンメチル	112	435	> 182
ピラゾリネート	101	439	> 173
ピリミノバックメチル(E)	110	362	> 330
ピリミノバックメチル(Z)	107	362	> 330
フィプロニル	115	435	> 330
フェントラザミド	95	350	> 83
フラメトピル	107	334	> 157
フルアジナム	103	463	> 416
プロベナゾール	85	224	> 41
プロマシル	109	261	> 205
ベンスルフロンメチル	105	411	> 149
ベンゾピシクロン	101	447	> 257
ベンゾフェナップ	114	431	> 105
ベンタゾン	129	239	> 197
ペントキサゾン	176	354	> 286
ボスカリド	108	343	> 307
メコプロップ(MCPP)	205	213	> 141
メソミル	123	163	> 88
メトリブジン	117	215	> 187
リニユロン	106	249	> 182

表 2-12 使用量・出荷量実績がない物質

物質名	回収率 (%)	測定質量数		
MPP-オキソン	123	263	>	231
MPP-オキシンスルホキシド	114	279	>	264
MPP-オキシンスルホン	116	295	>	217
MPP-スルホキシド	111	295	>	280
MPP-スルホン	113	311	>	125
アシベンゾラルS メチル	103	211	>	211
アメトリン	110	228	>	186
イナベンフィド	109	337	>	122
エトキシスルフロ	104	399	>	261
オキサジアルギル	108	341	>	223
カルプロパミド	110	334	>	139
カルボフラン	112	222	>	165
クロマフェノジド	94	395	>	175
ジクロメジン	98	255	>	89
ジクロルプロップ	289	233	>	161
シデュロン	117	233	>	94
シノスルフロ	115	414	>	183
ジフルベンズロン	110	311	>	158
シプロコナゾール	106	292	>	70
シプロジニル	110	226	>	93
シメコナゾール	108	294	>	70
チアクロプリド	113	253	>	126
テトラクロルピノホス(CVMP)	107	367	>	127
トリネキサパックエチル	114	253	>	207
トリフルミゾール	95	346	>	278
ナプロアニリド	115	292	>	171
ニテンピラム	130	271	>	126
ピメトジン	115	218	>	105
ピラゾスルフロエチル	118	415	>	182
ピリミホスメチル	110	306	>	164
フラザスルフロ	171	408	>	182
フルアジホップ	210	328	>	282
フルスルファミド	107	413	>	171
プロパニル	115	218	>	162
プロメトリン	108	242	>	158
ベンスリド(SAP)	101	356	>	158
ベンダイオカルブ	91	224	>	167
ホキシム	109	299	>	129
メミノストロビン(E)	106	285	>	194
モノクロトホス	116	224	>	193

## 2.3. まとめ

緊急時における機器分析による調査手法の検討として、GC/MS および LC/MS を用いた検討を行った。

GC/MS の検討では、測定毎に GC/MS の装置状態を一定レベルまで保持することが必要であり、クライテリアの測定で確認を行ったところ、評価基準より低い物質が確認された。機器調整を行ったが改善しなかったため、機器付属シリンジの交換による注入法の変更と測定前の飽和脂肪酸 10 種類混合標準溶液の注入を検討した。その結果、どちらも同様な改善効果があることが分かったため、簡易に実施できる飽和脂肪酸混合標準溶液を測定前に注入することとした。

また、指定された前処理方法(固相抽出法、液液抽出法)の比較検討を行った結果、抽出方法による差が見られなかったため、簡易な固相抽出法を用いることとした。

一方、II 型共同研究では、AIQS のデータベースの精度を上げるために、国環研から RI の再測定の依頼があったため、提示された物質リストから物質を選択し、再測定を行い、報告した。

LC/MS の検討では、河川底泥、琵琶湖底泥を用いて模擬濁水を作成し、確立した分析方法が適用可能かを検討した。20 物質について概ね測定可能であることが確認されたことから、緊急時においても適用できる可能性が示された。

また緊急時で早急な結果を求められるため分析時間の短縮化のためスイッチング分析の検討を行ったところ、概ね測定可能であり、分析時間の短縮が可能となった。

対象物質の追加検討として水道法の水質管理目標設定項目 91 種類を用いてスイッチング分析で測定したところ、88 物質は概ね検量線は良好であった。さらに、検討し確立した試料調製方法を用いて添加回収試験を行ったところ、回収率が 150% を超える物質もあったが、概ね良好な結果であった。これまでの検討により、スクリーニングの視点から、計 110 物質の分析が可能となった。

## 2.4. 結論

緊急時において原因究明や影響把握に係る調査を行うための調査手法を検討した。その結果、当センター保有機器の GC/MS で AIQS-GC を用いたスクリーニング分析法が活用できる可能性が示された。また、LC/MS 分析については、第五期で検討した分析方法が濁水においても適用可能であり、また、スクリーニングの視点から測定条件を見直し、測定時間の短縮が可能となった。さらに測定対象物質の追加検討を行い、計 110 物質の測定が可能となった。

これらの知見も活用し、今後は、苦情、事故事案時の原因究明、環境影響把握に行政機関が活用できることを目指していく。第七期 (R5-R7) では、「緊急時における原因物

質等調査手法の活用（調査解析4）」において、事故・苦情発生時に役立つ調査手法を発生頻度が高い「油流出」「白濁・着色」「泡立ち」「魚へい死」といった事象別に調査手法をとりまとめ、実案への適用を検討する。また、AIQSは、本来の定量法に比べて、マトリックスの影響や解析方法の習熟差により測定値に影響する可能性が高いため、今後は、添加回収試験を行って精度を確認していく予定である。

さらにLC/MSを用いた機器分析については引き続き、対象物質を増やしていく予定である。

### 3. 急性毒性試験による緊急時調査手法の検討

これまで述べてきた機器分析のみの結果では流出等した化学物質による水生生物への直接的な影響を評価することは困難である。

このことから、国環研と地環研においては、II型共同研究「生物応答を用いた各種水環境調査方法の比較検討」（令和2（2020）、3（2021）年度）および「多様な水環境の管理に対応した生物応答の活用に関する研究」（令和4（2022）～令和6（2024）年度）<sup>6)</sup>が進められているところである。当センターにおいても安全安心な水環境の維持に貢献するため、これらのII型共同研究に参画し、生物応答を用いて化学物質が水生生物へ与える影響を評価する手法を検討した。

行政からの緊急依頼があった際には迅速な対応が必要であるため、本研究では、技術的に容易で短期間での評価が可能な魚類急性毒性試験について、ゼブラフィッシュを用いた調査方法の検討を行った。

OECDガイドラインでは96時間後の結果をもって魚類への急性毒性を評価することとされているが、流出事故等の緊急時にはより迅速な影響確認が期待されている。そのため、より短時間で試験結果を推定できないか検討し、複数の化学物質が流出した際の複合影響の有無の評価もあわせて検討した。

また、試験に供する個体数の維持確保が魚類よりは容易で、判定時間が短いミジンコを用いた甲殻類遊泳阻害試験を並行実施することで、より柔軟に緊急対応が行えるのではないかと考え、オオミジンコを用いた甲殻類遊泳阻害試験を同じ化学物質で、最高濃度を合わせて実施した。

#### 3.1. 魚類急性毒性試験方法

急性毒性試験を行うにあたり、試験検体は国環研より購入したゼブラフィッシュを交配させ産卵したものをふ化育成して使用した（図3-1）。

試験方法は、OECDテストガイドライン No. 203「魚類急性毒性試験」（1992年）<sup>12)</sup>に準じて試験を実施し、試験条件、測定・評価方法は表3-1のとおりとした。



図3-1 ゼブラフィッシュの成魚（上：メス、下：オス）

表3-1 ゼブラフィッシュによる急性毒性に係る試験条件

項目	方法および条件
生物種	ゼブラフィッシュ
試験媒体	脱塩素水道水
試験期間	96 時間
試験濃度	5 濃度区、公比 2
生物数	7 尾/区
試験方式	止水式
助剤の使用	なし
試験溶体量	1L/区
試験温度	26°C
照明	12 時間/日
給餌	試験開始の 24 時間前まで毎日
測定	死亡数 (3, 6, 24, 48, 72, 96 時間) 水温、DO、および pH (1 回/日)
結果の算出	96 時間での 50% 死亡濃度 (LC50)

#### 【測定・評価】

曝露開始直後、3、6、24、48、72、96 時間後の魚の様子を観察し、死亡数を記録した。また、水温、DO および pH についても 24 時間毎に測定した。

曝露開始から 96 時間後の 50% 死亡濃度 (LC50-96h) を算出することにより評価を行った。

#### 3.1.1. 魚種・魚の成長度合い等による急性毒性試験結果の差異の収集

魚類急性毒性試験では、体長約 2cm の魚が 42 尾以上必要であるが、緊急時にそれらを確実に揃えるのは困難である。そこで当センターで保有している魚（大きさの異なる 3 種類のゼブラフィッシュ、下記①～③）および、市販の魚類（ヒメダカ、グッピー）を用いて急性毒性試験を実施し、魚種や魚の大きさによって感度に差が見られるかを調査した。

- ① 国立環境研究所系統のゼブラフィッシュで、ふ化後 6 か月程度以上経過した体長 2cm 程度のもの（以下、「ゼブラ国環研大」という。）

- ② 国立環境研究所系統のゼブラフィッシュで、ふ化後3か月程度経過した体長1cm程度のもの（以下、「ゼブラ国環研小」という。）
- ③ 市販のゼブラフィッシュ（以下、「ゼブラ市販」という。）
- ④ 市販のヒメダカ（以下、「ヒメダカ」という。）
- ⑤ 市販のグッピー（以下、「グッピー」という。）

急性毒性試験の対象とした物質に亜鉛（塩化亜鉛）を選定した。なお、亜鉛の水生生物保全環境基準は、河川および湖沼におけるいずれの類型でも0.03mg/Lと定められている。

### 3.1.1.1. 結果

急性毒性試験の結果、曝露開始から96時間後の死亡数は表3-2のとおりであった。

表3-2 96時間後の死亡数

	ゼブラ国環研大	ゼブラ国環研小	ゼブラ市販
対照区	0	0	0
20mg/L	0	1	3
40mg/L	6	6	7
80mg/L	7	7	7
160mg/L	7	7	7
320mg/L	7	7	7

それぞれの過半数致死濃度（LC50-96h）は以下のとおり算出された。（表3-3）

表3-3 魚種による亜鉛のLC50-96h

魚種	LC <sub>50</sub> -96h
ゼブラ国環研大	32.8mg/L
ゼブラ国環研小	28.3mg/L
ゼブラ市販	20.8mg/L

表3-3に示す通り、比較した3つのゼブラフィッシュ系統により得られたLC50間に2倍を超えるような差がなく、系統による大きな感度の差はないものと考えられる。

なお、OECDガイドラインでは、対照区の死亡率が曝露終了時に10%（10尾より少ない数を使った場合は1尾）を超えないことが試験の成立条件となっており、「ヒメダカ」および「グッピー」では、それを満たすことができなかった。

急性毒性試験の実施前には、用いる魚を試験に用いる飼育水にじゅん化させる必要があるが、「ゼブラ市販」、「ヒメダカ」、「グッピー」についてはじゅん化期間が不十分であった。大きな感度の差はないとしたものの、「ゼブラ市販」では「ゼブラ国環研大」や「ゼブラ国環研小」よりやや小さな値が導かれた。このことから、緊急性のある対応

が求められる場合には、じゅん化が確認できていない「ゼブラ市販」、「ヒメダカ」、「グッピー」を急性毒性試験に用いることはそぐわないことがわかった。急性毒性試験には、使用する魚種の、試験に用いる飼育水へのじゅん化が重要なことを再確認した。

### 3.1.2. 亜鉛を用いた精度管理試験

影響確認を行うにあたり、必要な影響度を正確に求めるため、OECDガイドラインの基準より各濃度区間の割合を狭めて、影響度をより精度よく求めることとした。

#### 3.1.2.1. 第1セット

20, 25, 30, 35, 40mg/Lの濃度区で試験を実施した。曝露開始から規定時間後毎の死亡数は表3-4のとおりであった。

表3-4 各時間における死亡数(単位：匹)

	3h	6h	24h	48h	72h	96h
対照区	0	0	0	0	0	0
20mg/L	1	2	7	7	7	7
25mg/L	0	0	5	6	6	6
30mg/L	2	7	7	7	7	7
35mg/L	4	5	7	7	7	7
40mg/L	1	5	7	7	7	7

35mg/Lの濃度区では3時間後に、また25mg/Lの濃度区では24時間後に着底の症状が見られた。

24時間を超過後に新たに死亡した個体は25mg/Lの濃度区で1個体のみで、新たに特筆すべき症状が観察された個体も存在せず、影響の大部分は24時間以内に確認された。

#### 3.1.2.2. 第2セット

第1セットで最小濃度区でも全個体が死亡したため、2.5, 5, 10, 15, 20mg/Lの濃度区で再度試験を実施した。曝露開始から規定時間後毎の死亡数は表3-5のとおりであった。

表3-5 各時間における死亡数(単位：匹)

	3h	6h	24h	48h	72h	96h
対照区	0	0	0	0	0	0
2.5mg/L	0	0	0	0	0	0
5mg/L	0	0	1	1	1	1
10mg/L	0	1	4	4	4	4
15mg/L	0	6	7	7	7	7
20mg/L	0	7	7	7	7	7

生存個体について、特筆すべき症状は観察されなかった。24 時間を超過後に新たに死亡した個体や新たに特筆すべき症状が観察された個体は存在せず、いずれの影響も 24 時間以内に確認された。

結果をもとに、ECOTOX<sup>13)</sup>を用いて Probit 法により用量反応曲線を作成した(図 3-2)。これより 96 時間後の 50% 死亡濃度(LC50-96h)を算出した結果は、8.2mg/L と算出された。

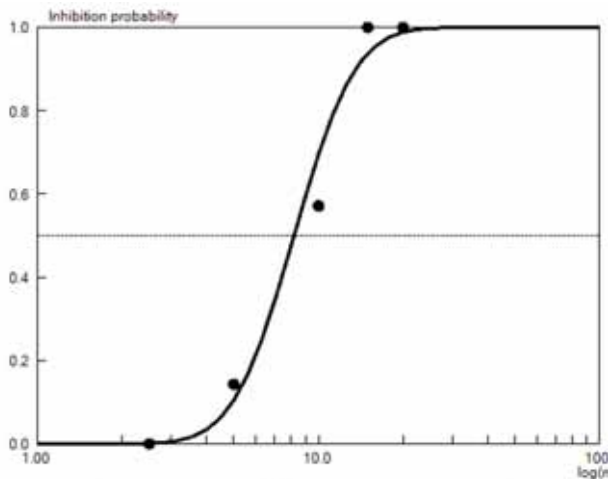


図 3-2 本試験結果から得られた用量反応曲線

### 3.1.2.3. 第3セット

第1セット及び第2セットの確認試験のために、2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40mg/Lの濃度区で試験を実施した。曝露開始から規定時間後毎の死亡数は表 3-6 のとおりであった。

表 3-6 各時間における死亡数(単位：匹)

	3h	6h	24h	48h	72h	96h
対照区	0	0	0	0	0	0
2.5mg/L	0	0	0	0	0	0
5mg/L	0	0	0	0	0	0
10mg/L	0	0	2	2	2	2
15mg/L	0	2	5	5	5	5
20mg/L	0	3	6	6	6	6
25mg/L	2	4	7	7	7	7
30mg/L	2	6	7	7	7	7
35mg/L	2	7	7	7	7	7
40mg/L	2	7	7	7	7	7

20mg/Lの濃度区では、3時間後に不活発の症状が見られた。

30mg/Lの濃度区では、3時間後に浮力異常の症状が見られた。

25mg/Lの濃度区では、6時間後に浮力異常の症状が見られた。

24時間を超過後に新たに死亡した個体や新たに特筆す

べき症状が観察された個体は存在せず、いずれの影響も 24 時間以内に確認された。

結果をもとに、ECOTOXを用いて Probit 法により用量反応曲線を作成した(図 3-3)。96 時間後の 50% 死亡濃度(LC50-96h)を算出した結果は、12.4mg/L と算出された。

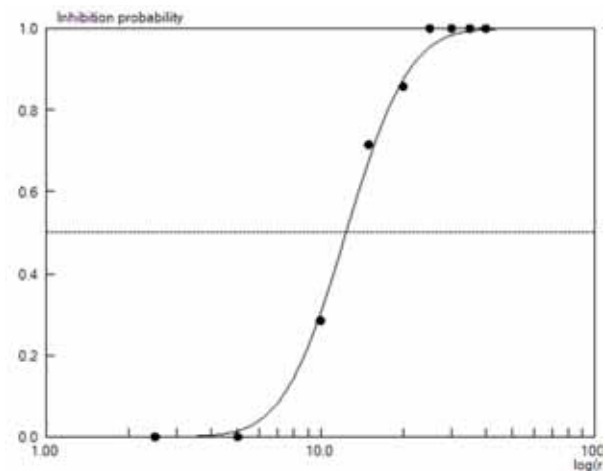


図 3-3 本試験結果から得られた用量反応曲線

なお、魚種・魚の成長度合い等による急性毒性試験結果の差異での試験では、LC50-96h はゼブラフィッシュの体長 2 cm 程度の個体で 32.8mg/L、体長 1 cm 程度の個体では 28.3mg/L であったが、今回は体長 1 cm 程度の個体を用いてこれらより値が小さかった。この原因は個体の大きさの差異ではなく、育成環境を大きく改善させたことによる環境の差異から生じたのではないかと推測している。

また、第1セットの試験では 25mg/L の濃度区の 1 個体を除き、全てが 24 時間以内に死亡し、特筆すべき症状についても 24 時間以内に観察されたため、OECD ガイドラインにある 96 時間経過時よりも短時間での死亡個体数および症状の有無により影響推定できる可能性が示された。

## 3.2. 甲殻類遊泳阻害試験の導入

これまで当センターでは、有害化学物質等が河川や琵琶湖等に流出する事故が発生した際に、水環境中への影響を迅速に把握するため、当該有害物質等の濃度把握と、当該水試料の魚毒性から判断して、その環境影響を推定する方法を検討してきた。しかしながら、OECD テストガイドライン No. 203「魚類急性毒性試験」(1992 年)<sup>12)</sup>は判定まで 96 時間を要し、試験に供する個体数の維持確保が難しく、柔軟な対応が困難な一面がある。

このため、試験に供する個体数の維持確保が魚類よりは容易で、判定時間が短いミジンコを用いた甲殻類遊泳阻害試験を並行実施することで、緊急対応が行えるのではないかと考え、ゼブラフィッシュを用いた魚類急性毒性試験とオオミジンコを用いた甲殻類遊泳阻害試験を同じ化学物質で、最高濃度を合わせて実施した。

### 3.2.1. 甲殻類遊泳阻害試験方法

試験検体の親には、国環研から入手したオオミジンコ (*Daphnia magna*) (図 3-4) を継代育成した。



図 3-4 オオミジンコ (*Daphnia magna*)

継代操作は、初めに仔を産んだ日から約3日後に、親を単離し、翌日に産まれた仔を1匹ずつ15mLの脱塩素水を入れた50mLビーカーに移し替えるまでの一連の作業を繰り返し行った。

餌は琵琶湖産の緑藻綱であるクロレラ (*Chlorella vulgaris*) をCT培地<sup>14)</sup>で培養し、約 $1 \times 10^8$  cells/mLにしたものを、週に5回、 $30 \mu\text{L}$ ずつ与えた<sup>15)</sup>。その他の条件は、OECDテストガイドライン No. 202「ミジンコ類急性遊泳阻害試験」(1984年)<sup>16)</sup>に準じて実施した。なお、試験条件、測定・評価方法は表3-7のとおりである。

表 3-7 ミジンコ類急性遊泳阻害試験条件

項目	方法および条件
試験物質	フェノール
生物種	オオミジンコ ( <i>Daphnia magna</i> ) 生後 24 時間未満
試験媒体	脱塩素水道水
試験期間	48 時間
試験濃度	最高濃度：40mg/L 濃度区数：5+対照区 公比：2
生物数	5頭4連/各濃度区
試験温度	20°C ± 1°C
照明	全て暗条件
観察測定	行動、静止、異常行動及び外見 DO、水温、pH(試験前後)
結果の算出	24, 48 時間 50% 遊泳阻害濃度 (EC50)

### 3.2.2. 甲殻類遊泳阻害試験結果

試験の結果を図3-5にまとめた。

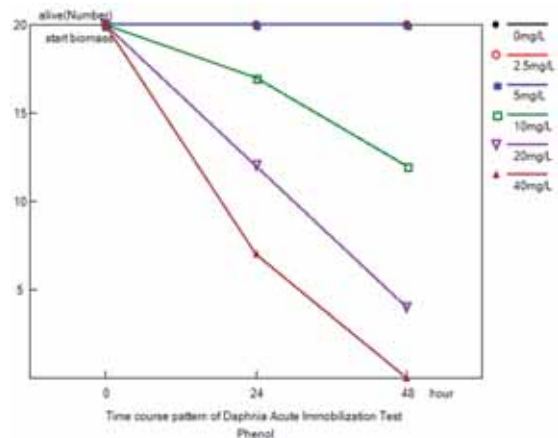


図 3-5 ミジンコ類急性遊泳阻害試験結果

対照区、2.5mg/L及び5mg/Lの濃度区では、遊泳阻害は確認されなかった。40mg/Lの濃度区では48時間後に全ての検体で遊泳阻害が確認された。

この結果から、ECOTOXを用いて、Probit法にて遊泳阻害率(EC50)を求めた。その結果を図3-6に示す。

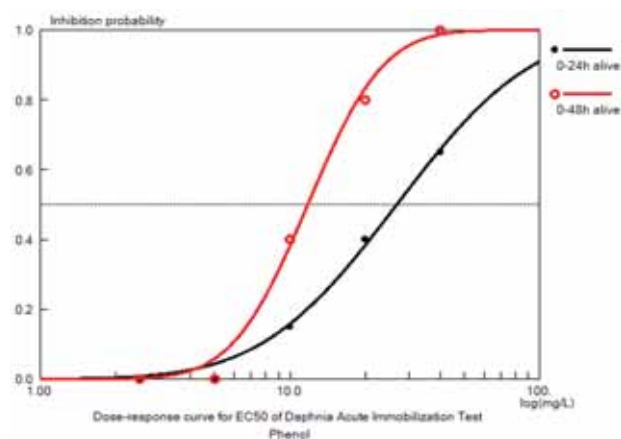


図 3-6 本試験結果から得られた用量反応曲線

EC50 (24h)は26.8mg/L、EC50 (48h)は11.8mg/Lとなった。国立環境研究所のデータ<sup>17)</sup>では、EC50 (48h)は15mg/Lであることから、概ね一致し、精度よく実施できたと推定できる。

### 3.2.3. 既存試験法との比較

甲殻類遊泳阻害試験と並行して、同条件でゼブラフィッシュを用いた魚類急性毒性試験を行った。試験条件、測定・評価方法は表3-8のとおりとした。

表 3-8 魚類急性毒性試験条件

項目	方法および条件
試験物質	フェノール
生物種	ゼブラフィッシュ
試験媒体	脱塩素水道水
試験期間	96 時間
試験濃度	最高濃度：40mg/L 濃度区数：5+対照区 公比：2
生物数	7 尾/区
試験方式	止水式
助剤の使用	なし
試験溶液量	1L/区
試験温度	26°C
照明	12 時間 照明/日
給餌	試験開始の 24 時間前まで毎日
測定	死亡数(3, 6, 24, 48, 72, 96 時間) 水温、D0、および pH(1 回/日)
結果の算出	96 時間 50%死亡濃度(LC50) 0%死亡最高濃度および 100%死亡最低濃度

曝露開始直後、3、6、24、48、72、96 時間後の魚の様子を観察し、死亡数を記録した。

曝露開始から規定時間毎の死亡数は表 3-9 のとおりであった。

表 3-9 各時間における死亡数(単位：匹)

	3h	6h	24h	48h	72h	96h
対照区	0	0	0	0	0	0
2.5mg/L	0	0	0	0	0	0
5mg/L	0	0	0	0	0	0
10mg/L	0	0	0	0	0	0
20mg/L	0	0	0	0	0	0
40mg/L	0	0	1	7	7	7

40mg/L の試験区では、3 時間後の観察で過活発が 3 匹確認された。6 時間後の観察で過活発が 3 匹および平衡喪失 1 匹が確認された。24 時間後の観察では、浮力異常 1 匹、横臥 1 匹、平衡喪失 3 匹及び死亡 1 匹が確認され、48 時間後に全個体の死亡を確認した。その他の濃度区では、20mg/L の試験区で 3 時間後に過活発が 1 匹観察されただけで、残りは全て正常であった。

本試験では、全個体の死亡または生存の区域しかなく、LC50 を求めることができなかった。このため、全く死亡を起こさない最高試験濃度と 100%死亡を起こす最低試験濃度の幾何平均を LC50 の近似値とみなした。その結果は 28.3mg/L であった。このため、LC50(96h)の国立環境研究所のデータ(17)では、25mg/L であり、概ね一致した結果となった。

### 3.2.4. 甲殻類遊泳阻害試験の導入まとめ

今回の試験では、魚類急性毒性試験で全個体の死亡または生存の試験濃度区のみで、LC50(96h)の近似値として、28.3mg/L を得た。一方で、ミジンコ急性遊泳阻害試験では、各濃度区の濃度差による影響の差が見られ、経時的な遊泳阻害を受ける個体数から、EC50(24h)が 26.8mg/L、EC50(48h)が 11.8mg/L を得た。

試験物質により、生物種への影響(応答)は異なることが知られており、今回の魚類急性毒性試験とミジンコ類急性遊泳阻害試験に用いたフェノールでは、オオミジンコの応答がゼブラフィッシュよりも短時間に低濃度で生じることが確認できた。これは、国立環境研究所のデータとも一致した。

### 3.3. 環境水を用いた II 型共同研究

II 型共同研究<sup>5)6)</sup>に参画し、統一試料(河川サンプル)を対象として、国立環境研究所系統のゼブラフィッシュを用いた急性毒性試験を実施した。試験の実施については、各参加機関が、各種の生物応答試験や機器分析試験を実施することにより行った。

濃度区は河川水の 80、40、20%希釈の 3 濃度区とした。すべての濃度区において生存は正常であり、対照区との有意差は認められなかったことから、当該河川水の LC50-96h は 80%以上と判断された。この結果について、他の試験機関が行った各種試験の結果と合致しており、当センターにおける飼育方法および急性毒性試験の技術確立と、試験精度の確認ができた。

### 3.4. まとめ

OECD ガイドラインでは、急性毒性試験の実施前には、用いる魚を試験に用いる飼育水にじゅん化させる必要があると定められている。ヒメダカおよびグッピーについては対照区での複数個体の死亡が確認され、じゅん化が不十分だったと考察された。またゼブラ市販については試験が成立したが、ヒメダカおよびグッピーと同様の条件であったため、試験不成立となる可能性があった。

このことは、より正確な生態影響の評価をするためには、あらかじめ、用いる魚を試験に適した個体であるか判別する必要がある、その確認をおこなわないまま、急性毒性試験等に用いることは不適切と推定される。特に、緊急性のある対応が求められる場合こそ、あらかじめ、用いる魚を長期間飼育し個体の管理を適切に行い、その個体の適性を確認してから試験実施することが望ましい。市販の魚をじゅん化させただけで試験可能な個体と判断できるかは、さらなる検討が必要である。

また、3.1.1 の試験(魚種・魚の成長度合い等による急性毒性試験結果の差異の収集で実施した試験)では、LC50-96h はゼブラフィッシュの体長 2 cm 程度の個体で 32.8mg/L、体長 1 cm 程度の個体では 28.3mg/L であったが、3.1.2 の



試験（精度管理試験）では体長 1 cm 程度の個体の LC50-96 h は 12.4mg/L で先の試験の値よりも小さくなった。この原因は試験に用いたゼブラフィッシュの育成環境を変えたことから生じたのではないかと推定している。このことは、魚類急性毒性試験の再現性について、現在の飼育環境では課題があると示唆される。

魚類急性毒性試験では多くの濃度区で 24 時間以内に死亡し、特筆すべき症状についてもほとんどが 24 時間以内に観察されたため、OECD ガイドラインにある 96 時間経過時よりも短時間で死亡個体数および症状の有無により影響推定できる可能性が示された。

亜鉛とフェノールの複合影響を調査した結果、亜鉛 2.5mg/L+フェノール 10mg/L、亜鉛 5mg/L+フェノール 10mg/L いずれの濃度区でも、致死や行動異常・形態異常はなく、亜鉛の 96 時間後の 50%死亡濃度 (LC50-96h) は 8.2mg/L であったため、フェノールの存在が亜鉛の影響を増幅させる複合影響は確認できなかった。

生物種への影響（応答）は異なることが知られており、今回の魚類急性毒性試験と甲殻類急性遊泳阻害試験に用いたフェノールでは、オオミジンコの応答がゼブラフィッシュよりも短時間で低濃度で生じることが確認できた。これは、国立環境研究所のデータとも一致した。

生物応答を用いた各種水環境調査方法の比較検討に関する II 型共同研究に参画し、生物応答試験に関する国の動向や最新の知見を得た。また、本共同研究において、同一試料を対象としてゼブラフィッシュを用いた急性毒性試験を実施し、他機関が行った各種試験結果と合致していたことから、当センターの試験精度の確認をすることができた。

### 3.5. 結論

有害化学物質等が河川や琵琶湖等に流出した際に、水環境中への影響を迅速に把握するために、魚へい死事故につながるかを、試験生物であるゼブラフィッシュを流出事故現場の試水（希釈なし）に入れ、異常行動や死亡の有無で魚毒性（魚類急性毒性試験による）を確認しようと検討してきた。

しかし、96 時間よりも短期間での影響推定や事故発生時のスクリーニング調査を行えるための検討を行い、安全な水環境や地域住民の安心感に資することができるようにしたい。

このため、感度良く、応答性が良い生物種を用いた、生態系への影響を評価できるバイオアッセイが必要ではないかと考え、甲殻類遊泳阻害試験を実施した。平常時と異常時を判別可能か判断するためには、例えば琵琶湖流入河川での平常時の試水を用いて、異常行動や死亡個体のないことを確認する必要があると考えており、検討していきたい。

また、実施した甲殻類遊泳阻害試験には国環研のオオミ

ジンコを使用した。琵琶湖水系の生態系影響を推定するためには、琵琶湖に生息するプリカリア (*Daphnia pulicaria*) やカブトミジンコ (*Daphnia galeata*) を用いた方が評価の信頼性が保てるのではないかと考えており、こちらも検討していきたい。

なお、本格的に甲殻類遊泳阻害試験を導入するためには、試験精度の確認とともに技術的な向上が必要となる。このため、今後は必要な毒性情報の文献からの収集と、実際に遊泳阻害試験を行い、文献値との差異による精度確認や、試験物質による実験データを蓄積するほか、II 型共同研究でのバイオアッセイにも積極的に参加し、情報と知見の共有を図っていきたい。

## 4. 引用文献

1) 国土交通省 (2022) : 令和 4 年版 国土交通白書 2022 序章

<https://www.mlit.go.jp/statistics/hakusyo.mlit.r4.html>

2) 総務省 : 公害苦情調査

<https://www.soumu.go.jp/kouchoi/knowledge/report/main.html>

3) 経済産業省:PRTR 制度対象化学物質

[https://www.meti.go.jp/policy/chemical\\_management/1aw/prtr/2.html](https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/1aw/prtr/2.html)

4) 国立研究開発法人国立環境研究所 : 災害環境研究プログラム

<https://www.nies.go.jp/program/environmental.html>

5) 国立研究開発法人国立環境研究所 : 2019 年度地方環境研究所等との共同研究応募課題一覧

<https://www.nies.go.jp/kenkyu/chikanken/kadai/h31.html>

6) 国立研究開発法人国立環境研究所 : 2022 年度地方環境研究所等との共同研究応募課題一覧

<https://www.nies.go.jp/kenkyu/chikanken/kadai/r04.html>

7) 居川俊弘、佐貫典子、井上健、河原晶、宮下康雄、田中節彦、萩原裕規、古田世子、池田将平、大柳まどか、中村美穂、桐山徳也、津田泰三、一瀬諭 (2020) : 化学物質の影響把握と緊急時事故対応のための基盤構築、滋賀県琵琶湖環境科学研究センター研究報告書、14 : 183-202

8) 国立研究開発法人国立環境研究所 : 2020. 2. 21 公開講演会 事故・災害時における半揮発性物質モニタリングのための網羅的分析法の開発 (門上希和夫教授提供)

[https://www.nies.go.jp/res\\_project/s17/dsstrchrisk/2019/pss/7\\_s17pslide20200221.pdf](https://www.nies.go.jp/res_project/s17/dsstrchrisk/2019/pss/7_s17pslide20200221.pdf)

9) 阿久津和彦 (2020) : 残留農薬分析におけるアナライトプロテクタントとしての脂肪酸混合物の有用性、林純葉

<https://direct.hpc-.co.jp/shop/pages/hpcnews51.aspx>

1

10) 環境省水・大気環境局水環境課 令和5年3月:

AIQS-GCによるスクリーニング分析法暫定マニュアル

11)

法第5条第2項に基づく届出状況について

<http://www.pref.shiga.lg.jp/file/attachment/5172622>

.pdf (2023年2月閲覧)

12) Draft OECD test Guideline 203, OECD Guideline for testing of chemicals.

OECD, (1992)

13) EcoTox and PAS program

<https://yoshiokayy.wixsite.com/mysite>

14) 培地リスト, NIES collection

15) 一瀬諭, 若林徹哉, 伊藤貢: ミジンコを用いた急性遊泳阻害試験について, 滋賀県立衛生環境センター所報, 36, 89~92, 2001

16) Draft OECD test Guideline 202, OECD Guideline for testing of chemicals.

OECD, (1984)

17) 化学物質データベース WebKis-Plus, 国立環境研究所

<https://www.nies.go.jp/kisplus/dtl/chem/YOT00367>

## 5. 執筆分担

本研究は、環境監視部門化学環境係と同部門生物圏係とで実施した。本研究の原稿執筆は、「3. 急性毒性試験による緊急時調査手法の検討」とこれに関連する部分を生物圏係が担当し、その他の部分を化学環境係が担当した。