

化学物質の影響把握と緊急事故対応のための基盤構築

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・中村光穂・桐山徳也¹⁾・津田泰三²⁾・一瀬 諭²⁾

要約

琵琶湖流域での化学物質の検出状況を把握するため、臭素系難燃剤ヘキサブロモシクロドデカン(HBCD)およびリン酸エステル系難燃剤を対象に、液体クロマトグラフ質量分析装置(LC/MS)を用いた一斎分析法を確立した。確立した一斎分析法を用いてモニタリングを行うとともに、その結果をもとに環境省のガイドラインに準拠した初期リスク評価を行った。併せて、前期計画で一斎分析法を確立したベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤について、モニタリングを行うとともに、その結果をもとに初期リスク評価を行った。また、水生生物保全に係る要監視項目であるフェノールとアニリンについて、迅速前処理カートリッジを用いた同時分析法について検討を行った。

生物応答を用いた生態影響試験は、前述のような個々の化学物質濃度の評価では捉えられない未知の化学物質や複数の化学物質による影響や毒性の有無を総体的に把握・評価できる。このため、環境省が新たな排水管理手法として導入を検討していた生態影響試験のうち、ゼブラフィッシュを用いた試験について、国立環境研究所および地方環境研究所とのⅡ型共同研究（以下、「Ⅱ型共同研究」とする）に参画するなど技術的検討を行った。

機器分析や供試生物の飼育・継代培養技術を応用して、化学物質流出など水質汚濁事故発生時における原因究明や影響把握等に活用することを目的として、LC/MSを用いた迅速分析方法を検討するとともに、ゼブラフィッシュを用いた急性毒性試験の検討を行った。

1. はじめに

現代の社会においては、私たちの生活を豊かにするために、産業活動や日常生活の中で多種多様な化学物質が利用されている。これらの化学物質の中には、人の健康及び生態系に対し有害性を持つものも存在していることから、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）」、「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律（PRTR 法）」等により、化学物質の使用前、使用中についての監視・規制がなされている。また、「水質汚濁防止法」に基づき、工場・事業場からの排出水規制や公共用水域・地下水における常時監視を実施している。規制や監視の対象となる化学物質は年を追うごとに増加しており、2020年5月28日には、人の健康の保護に関する要監視項目としてペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)及びペルフルオロオクタン酸(PFOA)が追加されたところである¹⁾。

規制・監視の対象となっている化学物質は増加しているにもかかわらず、琵琶湖流域における検出状況や有害性、環境残留性等に関する情報は依然として不足

している。一方、環境基準項目や要監視項目等モニタリング対象となる化学物質が増加する中、一斎分析を取り入れることにより省力化を図りながら琵琶湖流域での化学物質の検出実態を把握する必要がある。

そこで当センターでは、水質汚濁防止法に基づく排出水規制や常時監視の対象となっていない化学物質を中心に、分析の省力化と琵琶湖流域での検出状況の把握を目的として「未規制化学物質の一斎分析による実態把握」、化学物質総量としてのリスク評価を行うため、国が制度導入を検討していた生態影響試験法(WET 試験法)に関する情報の入手、活用方法の検討を目的として「生態影響試験の活用方法の検討」、また、上記の研究で得られる技術や知見を化学物質流出などの水質汚濁事故発生時における原因究明や影響把握等に活用することを目的として、「緊急事故対応のための基盤構築」に取り組んだので、各テーマにおける研究結果を報告する。

1)現：琵琶湖環境部環境政策課、2)既退職

2. 未規制化学物質の一斉分析による実態把握

環境基準値の設定や排水規制の対象となっていない医薬品・生活由来化学物質(PPCPs)など、全国的に存在状況の把握が進められている化学物質について、琵琶湖流域における検出状況を把握するため、臭素系難燃剤であるヘキサブロモシクロドデカン(Hexabromo-cyclododecane、以下「HBCD」とする)およびリン酸エチル系難燃剤(Phosphate Flame Retardants、以下「PFRs」とする)を対象に、液体クロマトグラフ質量分析装置(LC/MS)を用いた一斉分析法を確立した。確立した一斉分析法を用いて琵琶湖水中の濃度レベルの把握を行うとともに、その検出値について環境省のガイドライン²⁾に準拠したリスク評価を行ったので、その結果について報告する。また、前期計画³⁾で一斉分析法を確立したベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤についても調査を実施しており、その結果についても報告する。

さらに、水生生物保全に係る要監視項目であるフェノールとアニリンについて、迅速前処理カートリッジを用いた同時分析法について検討を行ったのでその結果を報告する。

2.1. ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の検出状況の把握

劣化防止を目的としてプラスチック製品に使用されるベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤について、前期計画で確立したガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)を用いた一斉分析により、琵琶湖水における検出状況を調査した。

対象物質は、紫外線吸収能力が優れ、国内外に幅広く使用されるUV-P、UV-326、UV-327およびUV-328の4物質とした。

2.1.1. 方法

2.1.1.1. 調査地点・調査時期

琵琶湖における調査地点は、滋賀県の公共用水域測定計画⁴⁾に掲げる琵琶湖・瀬田川水質調査(以下「琵琶湖・瀬田川水質調査」という。)地点のうち、8地点(北湖4地点、南湖4地点)である(図1)。

調査実施時期は、2017年5月、8月、11月および2018年2月の四半期ごとに、ステンレス製バケツにより表層水(水深0.5m)をガラス瓶に採取した。いずれの試料も採取後直ちに冷蔵保存し、速やかに分析に供した。

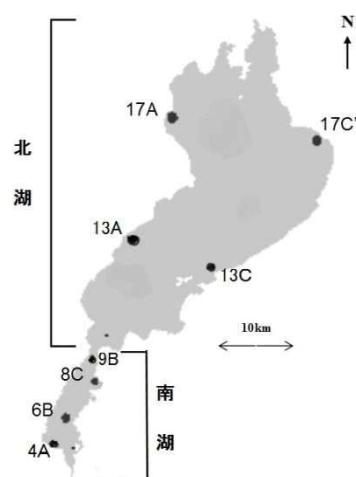


図1 ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤に係る琵琶湖水質調査地点

2.1.1.2. 分析方法

分液ロートに試料をとり、塩化ナトリウムおよび塩酸を添加し、ヘキサンにより溶媒抽出した後、ヘキサン層をロータリーエバポレーターで濃縮した。その後、ヘキサンで定容し、内標準物質を添加後、GC/MS(測定モード: MS/MS)に供し検量線法により定量した(図2)。

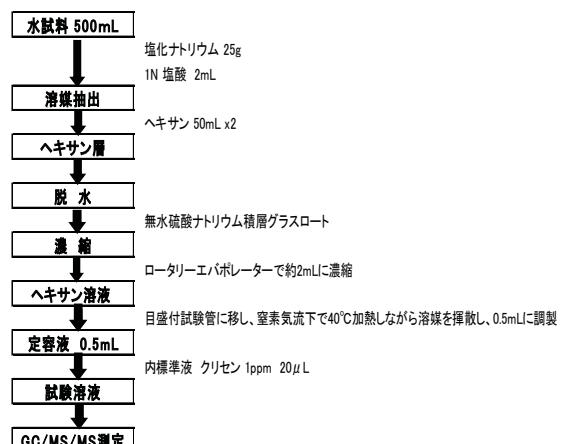


図2 ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の一斉分析に係る分析フロー

使用した試薬を表1に、GC/MSの測定条件を表2、表3に示す。また、検量線の作成方法を以下に示す。

表1 ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤分析に係る使用試薬

ヘキサン: 関東化学製残留農薬試験用

塩化ナトリウム: 関東化学製残留農薬試験用

無水硫酸ナトリウム: 関東化学製残留農薬試験用

表 2 ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤分析に係る
GC/MS 測定条件

GC : Thermo Fisher Scientific Trace 1310				
カラム : RESTEK Rtx-5MS (30m × 0.25mm i.d., 膜厚 0.25 μm)				
注入口温度 : 250°C				
注入量 : 1 μL				
注入方式 : スプリットレス				
キャリアーガス : He				
流速 : 1.0 mL/min				
カラム温度				
50°C (1min) → 10°C/min → 300°C (5min)				
MS : Thermo Fisher Scientific TSQ 8000Evo				
イオン化法 : EI				
イオン化電圧 : 70eV				
イオン化電流 : 50 μA				
トランスマスクーライン温度 : 300°C				
イオン源温度 : 230°C				

表 3 ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤 MS/MS 測定条件

化合物名	プリカーサーイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)		定量限界ng/L
		定量	定性	
UV-P	225	168	154	1.0
UV-326	300(315)	119	(300)	1.0
UV-328	322	252	133	1.0
UV-327	357(342)	342	(286)	1.0
内標 クリセン-d12	240	236	212	-

[検量線の作成]

紫外線吸収剤 4 種類の混合標準液各 1 μg/mL (ヘキサン溶液) から 0、10、20、50、100、200 μL を共栓付試験管 10mL に採取し、10mL に希釈して検量線標準液 0~0.02 μg/mL を調製する。各標準液 1mL に内標準液クリセン-d12 (ヘキサン溶液) 40 μL を添加し、GC/MS 測定用試験溶液とする。

2.1.2. 結果

2017 年度の調査結果を表 4 に示す。対象とした 4 物質のうち、UV-327 はいずれの地点においても定量下限値未満であった。

表 4 ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤測定結果
(2017 年度)

化合物名	琵琶湖水濃度(ng/L)			
	5月	8月	11月	2月
UV-P	<1~3	<1~4	<1~2	<1~3
UV-326	<1~6	<1~2	<1~4	<1~1
UV-328	<1~17	<1~1	<1~5	<1
UV-327	<1	<1	<1	<1

物質ごとに最も検出濃度が高かった地点は、UV-P が 13C (8 月)、UV-326 が 8C (5 月)、UV-328 が 6B (5 月) であった。これらの検出値については、後述の 2.4. において初期リスク評価を行った。

2.2. HBCD の一斉分析法の検討及び検出状況の把握

臭素系難燃剤の 1 種である HBCD は、発泡ポリスチレンやポリエステル繊維の難燃剤として広く使用されてきた。難分解性、高濃縮性であることから、2013 年に残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約 (POPs 条約) 付属書 A に追加、2014 年には化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法) 第一種特定化学物質に指定され、現在では製造・使用が禁止されている。しかしながら、HBCD は 2011 年度の製造・輸入量が 2,646t⁵⁾と近年まで使用されており、HBCD を含有する製品は現在も広く使用されていると考えられることから、これらの製品の使用や廃棄により HBCD が水環境中に流出する可能性は否定できない。

HBCD には多くの異性体が存在するが、当センターでは、工業製品中に存在し、環境中での検出事例が多い 3 つの異性体 (α 体、β 体、γ 体) を測定対象とした (図 3)。

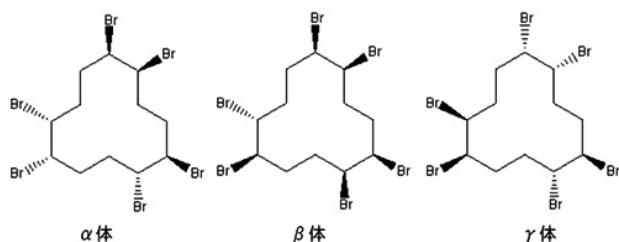


図 3 HBCD 構造式

2.2.1. 方法

2.2.1.1. 調査地点・調査時期

琵琶湖・瀬田川における調査地点は、琵琶湖・瀬田川水質調査地点のうち、7 地点 (北湖 4 地点、南湖 2 地点、瀬田川 1 地点) とした (図 4)。

調査実施時期は、2018 年 2 月、5 月、8 月、11 月の四半期ごとに、ステンレス製バケツにより表層水 (水深 0.5m) をガラス瓶に採取した。地点 17B では、表層に加えて水深 85m の水も採取した (除 5 月)。いずれの試料も採取後直ちに冷蔵保存し、速やかに分析に供した。

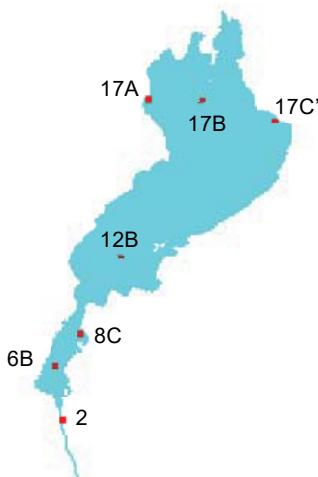


図4 HBCDに係る琵琶湖・瀬田川水質調査地点

2.2.1.2. 分析方法

分析方法は、西野ら⁶⁾の方法を参考に、以下の通りとした。水試料約1Lにサロゲート(α 、 β 、 γ -HBCD-¹³C₁₂)を5ng添加後、ガラス纖維ろ紙を上に重ねた固相ディスクに通水した。60%メタノールで容器の洗い込みと固相ディスク(ガラス纖維ろ紙含む)の洗浄を行った。固相ディスクを40°Cで1時間乾燥後、アセトン1回、ヘキサン2回の順で超音波抽出を行った。抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮後、クリーンアップを行い、これを窒素吹付で乾固寸前まで濃縮し、シリジンスペイク(α -HBCD-d₁₈)を5ng添加した。80%メタノールで1mLに定容し、LC/MS/MSで分析を行った。(図5)。

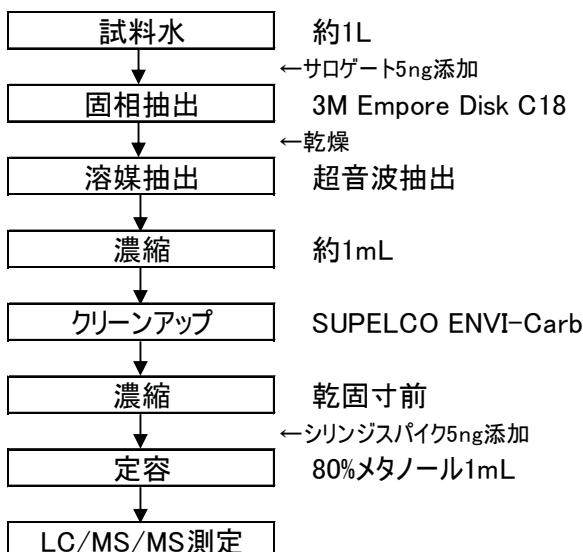


図5 HBCD分析に係る分析フロー

使用した試薬等を表5、LC/MSの測定条件を表6に示す。

表5 HBCD分析に係る使用試薬等

アセトン、ヘキサン：富士フィルム和光純薬製残留農薬試験用
メタノール：富士フィルム和光純薬製LC/MS用
ガラス纖維ろ紙：東洋漉紙製ADVANTEC GA-100
固相ディスク：3M製Empore C18
クリーンアップ用カートリッジ：SUPELCO製ENVI-Carb

表6 HBCD分析に係るLC/MS測定条件

LC : Waters Acquity UPLC H-Class
カラム : CAPCELL CORE C18 2.7 μm 2.1 x 100mm (SHISEIDO)
移動相A : 2 mM酢酸アンモニウム水溶液
移動相B : メタノール
移動相C : アセトニトリル
グラジェント
0→3.5min A:25→21% B:67.5→71.1% C:7.5→7.9%
3.5→7min A:21→0% B:71.1→90% C:7.9→10%
7→9min A:0% B:90% C:10%
9→9.5min A:0→25% B:90→67.5% C:10→7.5%
9.5→13min A:25% B:67.5% C:7.5%
流速 : 0.5 mL/min
カラム温度 : 40°C
注入量 : 10 μL
MS : AB Sciex TRIPLE QUAD 4500
イオン化法 : ESI(Negative)
MS測定法 : MRM
Curtain Gas(CUR) : 20
Collision Gas (CAD) : 8
IonSpray Voltage (V) : -4000
Temperature (°C) : 350
Ion Source Gas 1 : 80
Ion Source Gas 2 : 70
モニターイオン
HBCD-81 プレカーサー : m/z=640.6 プロダクト : m/z=81.0
HBCD-79 プレカーサー : m/z=640.6 プロダクト : m/z=79.0
¹³ C ₁₂ HBCD-81 プレカーサー : m/z=652.7 プロダクト : m/z=80.9
¹³ C ₁₂ HBCD-79 プレカーサー : m/z=652.7 プロダクト : m/z=78.9
d ₁₈ HBCD-81 プレカーサー : m/z=657.8 プロダクト : m/z=81.0
d ₁₈ HBCD-79 プレカーサー : m/z=657.8 プロダクト : m/z=79.0

2.2.2. 結果と考察

2.2.2.1. 分析方法の精度

装置検出下限値(IDL)、測定方法の検出下限値(MDL)および定量下限値(MQL)を化学物質環境実態調査実施の手引き(平成27年度版)⁷⁾に基づき、7回の繰り返し測定から算出した。結果は表7の通りであった。

MDL算出の際の添加濃度は約0.05ng/Lとし、回収率は95%前後、サロゲートの絶対回収率は90%前後といずれも良好であった。

表7 HBCDのIDL、MDLおよびMQL

	装置検出下限(IDL)	分析方法における検出下限(MDL)	定量下限(MQL)
α -HBCD	0.0099ng/mL	0.021ng/L	0.054ng/L
β -HBCD	0.0065ng/mL	0.023ng/L	0.058ng/L
γ -HBCD	0.010ng/mL	0.013ng/L	0.033ng/L

2.2.2.2. 琵琶湖・瀬田川水質調査結果

図4に示す7地点で採取した試料のHBCD濃度を測定したところ、瀬田川(地点2)を除く琵琶湖6地点では調査を行った4回すべてでいずれの異性体もMDL未満(ND)であった。地点17B水深85mの試料もNDであった。

瀬田川(地点2)では、5月に γ 体が、11月に α 体と γ 体が検出された。瀬田川での各月の結果を表8に、11月調査時のクロマトグラムを図6に示す。これらの検出値については、2.1.2と同様に後述の2.4において初期リスク評価を行った。

表8 瀬田川(地点2)でのHBCD測定結果(ng/L)

	2月	5月	8月	11月
α -HBCD	ND	ND	ND	tr(0.051)
β -HBCD	ND	ND	ND	ND
γ -HBCD	ND	tr(0.033)	ND	0.089
t-HBCD	ND	tr(0.033)	ND	0.14

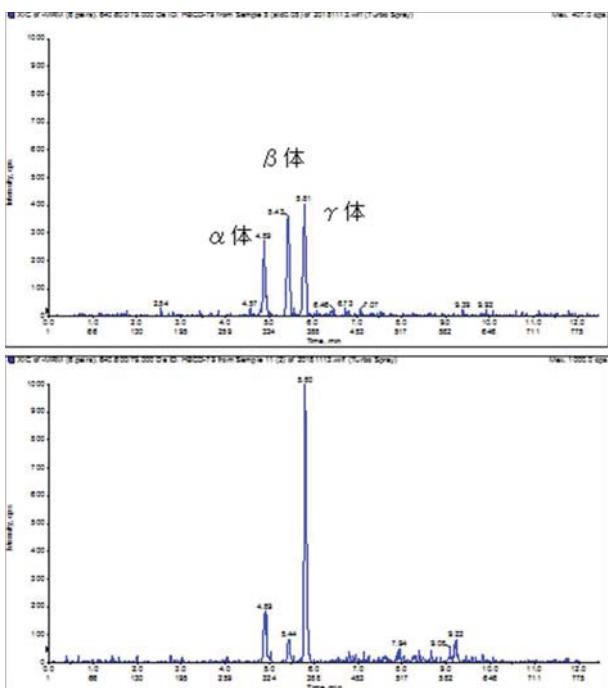


図6 11月調査時のHBCDを測定したLC/MSクロマトグラム
(上:0.05ng/mL標準溶液、下:地点2試料)

2.3. PFRsの一斉分析法の検討及び検出状況の把握

PFRsは、パソコンなど電子機器類等に使われる高分子材料の難燃剤や可塑剤として古くから使用されており、近年はHBCDをはじめとする臭素系難燃剤の使用制限、使用禁止によりその代替品としての利用が増加している⁸⁾ことから、環境中での検出事例が多数報告されている^{9, 10)}。

対象物質は、先行する調査事例等を参考に、表9に示す8種類とした。

表9 PFRsに係る調査対象物質

物質名	分子量
リン酸トリエチル(TEP)	182.15
リン酸トリプロピル(TPP)	225.40
リン酸トリブチル(TBP)	266.31
リン酸トリフェニル(TPhP)	326.28
リン酸トリス(2-ブキシエチル)(TBOEP)	398.47
リン酸トリス(2-クロロエチル)(TCEP)	285.48
リン酸トリス(2-クロロ-1-メチルエチル)(TCIPP)	327.57
リン酸トリス(1,3-ジクロロ-2-プロピル)(TDCPP)	430.90

2.3.1. 方法

2.3.1.1. 調査地点・調査時期

琵琶湖・瀬田川における調査地点は、HBCD調査と同じ7地点(北湖4地点、南湖2地点、瀬田川1地点)とした(図4)。

調査実施時期は、2019年11月および2020年2月であり、ステンレス製バケツにより表層水(水深0.5m)をガラス瓶に採取した。いずれの試料も採取後直ちに冷蔵保存し、速やかに分析に供した。

2.3.1.2. 分析方法

水試料200mLにサロゲートを5ng添加後、ガラス製リザーバーに接続した固相カートリッジに通水した。超純水で容器の洗い込みと固相カートリッジの洗浄を行った。固相カートリッジを窒素通気で乾燥し、アセトンで溶出した。これを窒素吹付で乾固寸前まで濃縮し、80%メタノールで1mLに定容し、LC/MS/MSで分析を行った(図7)。

なお、TBOEPとTCIPPについてはサロゲートが入手できなかったため、リテンションタイム(R.T)が比較的近いもの(それぞれTBP、TDCPP)で代用した。

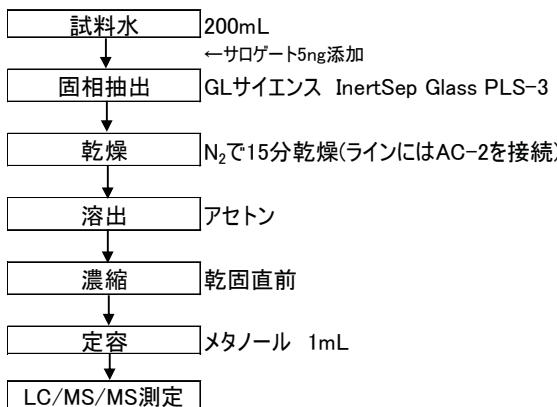


図 7 PFRs 分析に係る分析フロー

前述のとおり、PFRs は高分子材料の可塑剤としても用いられているため、全自動固相抽出装置を用いた通常の操作を行うと、装置由来の汚染により分析不能となる。そのため、固相抽出装置の試料吸引ラインの前に固相カートリッジを取り付け、ガラス製リザーバーから試料を導入することとした(図 8)。



図 8 PFRs 分析における固相抽出

また、LC/MS の装置由来のプランクが見られたことから、LC のミキサー(溶媒混合部)と試料導入部の間にリテンションギャップカラムを使用した。例として TPhP のクロマトグラムを図 9 に示す。このクロマトグラムにおいて、R. T=10.55 のピーク (A) が注入ピーク、R. T=11.32 のピーク (B) が機器由来ピークである。

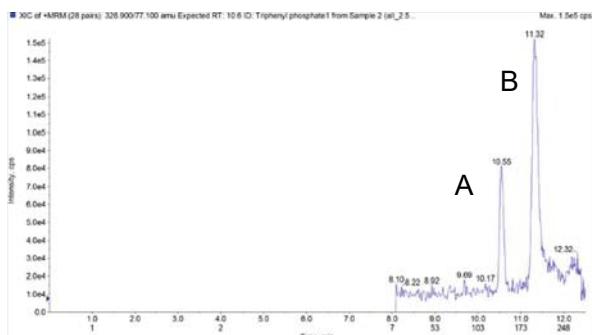


図9 リン酸トリフェニル(2.5ng/mL)のクロマトグラム

使用した試薬を表 10、LC/MS の測定条件を表 11 に示す。

表 10 PFRs 分析に係る使用試薬等

アセトン	富士フィルム和光純薬製残留農薬試験用
メタノール	富士フィルム和光純薬製LC/MS用
固相カートリッジ	GLサイエンス製InertSep Glass PLS-3

表 11 PFRs 分析に係る LC/MS 測定条件

LC : Waters Acuity UPLC H-Class
カラム : CORTECS UPLC C18+ 1.6um 2.1 x 100mm (Waters)
リテンションギャップカラム : CORTECS UPLC C18+ 1.6um 2.1 x 100mm (Waters)
移動相A : 5mM酢酸アンモニウム水溶液
移動相B : メタノール
グレジェント
0→0.5min A:70% B:30%
0.5→7.5min A:70→1% B:30→99%
7.5→12.5min A:1% B:99%
12.5→13min A:1→70% B:99→30%
13→18min A:70% B:30%
流速 : 0.2mL/min
カラム温度 : 40°C
注入量 : 2μL
MS : AB Sciex TRIPLE QUAD 4500
イオン化法 : ESI(Positive)
MS測定法 : MRM
Curtain Gas (CUR) : 30
Collision Gas (CAD) : 8
IonSpray Voltage (V) : 5500
Temperature (°C) : 500
Ion Source Gas 1 : 50
Ion Source Gas 2 : 40
モニターオン
TEP ブレカーサー : m/z=182.9 プロダクト : m/z=81.0, 99.0
TPP ブレカーサー : m/z=225.2 プロダクト : m/z=81.0, 99.0
TBP ブレカーサー : m/z=267.0 プロダクト : m/z=81.0, 99.0
TPhP ブレカーサー : m/z=326.9 プロダクト : m/z=77.1, 152.0
TBOEP ブレカーサー : m/z=399.2 プロダクト : m/z=199.1, 299.1
TCEP ブレカーサー : m/z=284.9 プロダクト : m/z=63.0, 99.0
TCIPP ブレカーサー : m/z=326.8 プロダクト : m/z=81.0, 99.0
TDCPP ブレカーサー : m/z=430.8 プロダクト : m/z=81.0, 98.9
TEP-d15 ブレカーサー : m/z=198.1 プロダクト : m/z=101.9, 83.0
TPP-d21 ブレカーサー : m/z=246.1 プロダクト : m/z=102.0, 83.0
TBP-d27 ブレカーサー : m/z=294.2 プロダクト : m/z=102.0, 83.0
TPhP-d15 ブレカーサー : m/z=342.1 プロダクト : m/z=82.1, 160.0
TCEP-d12 ブレカーサー : m/z=296.9 プロダクト : m/z=67.0, 102.0
TDCPP-d15 ブレカーサー : m/z=445.8 プロダクト : m/z=102.1, 78.9

2.3.2. 結果と考察

2.3.2.1. 分析方法の精度

装置検出下限値 (IDL)、測定方法の検出下限値 (MDL) および定量下限値 (MQL) を化学物質環境実態調査実施の手引き(平成 27 年度版)⁷⁾に基づき、繰り返し測定から算出した。

前述のとおり装置由来の汚染が見られ、物質によりその度合いが異なることから、IDL 算出に用いた標準溶液は、TPhP が 0.5ng/mL、TDCPP が 0.1ng/mL、TCEP と TCIPP が 0.05ng/mL、それ以外は 0.02ng/mL とした。結果を表 12 に示す。

表 12 PFRs の IDL

物質	TEP	TPP	TBP	TPhP
IDL(ng/mL)	0.0086	0.0058	0.0051	0.23
IDL 試料換算値(ng/L)	0.043	0.029	0.026	1.2
CV(%)	10.5	5.4	6.2	13.6
物質	TBOEP	TCEP	TCIPP	TDCPP
IDL(ng/mL)	0.0042	0.016	0.019	0.051
IDL 試料換算値(ng/L)	0.021	0.080	0.095	0.25
CV(%)	6.0	7.6	11.5	13.9

MDL 算出においても、様々な原因と思われる汚染が見られたこと、予備試験から琵琶湖水にある程度の濃度で存在していることが予想されたことから、MDL 算出に用いる試料として、TPP と TPhP 以外は超純水を用いた。

TPP は琵琶湖水に 0.1ng/L となるよう、TPhP は琵琶湖水に 5ng/L となるよう標準溶液を添加したものを試料とした。結果を表 13 に示す。サロゲート回収率は、73.2% (TEP) ~ 95.2% (TDCPP) といずれも良好であった。超純水から算出した試料については、CV が比較的高くなつた。プランクの原因が特定できていないため、試料間によるばらつきが大きくなつたものと考えられる。

表 13 PFRs の MDL、MQL

物質	TEP	TPP	TBP	TPhP
MDL(ng/L)	0.38	0.046	0.34	1.4
MQL(ng/L)	1.0	0.12	0.89	3.6
CV(%)	19.9	13.4	16.5	5.2
サロゲート回収率(%)	73.2	77.3	81.6	90.8
物質	TBOEP	TCEP	TCIPP	TDCPP
MDL(ng/L)	0.078	0.87	2.7	2.7
MQL(ng/L)	0.21	2.3	7.2	7.1
CV(%)	18.5	29.0	31.3	24.3
サロゲート回収率(%)	—	95.0	—	95.2

2.3.2.2. 琵琶湖・瀬田川水質調査結果

図 4 に示す 7 地点で採取した試料の PFRs 濃度を測定した結果を表 14 に示す。また、地点間・調査時期での比較のため積み上げグラフとしたものを図 10 (カラー図表参照) に示す。2 回の調査において、PFRs 8 種類中 TPP を除く 7 種類を検出した。調査時期の違いによる検出状況の大きな違いはなく、地点別では琵琶湖流出河川である瀬田川 (地点 2)、南湖東岸 (地点 8C) で全体的に他地点より濃度が高く、種類別ではいずれの地点も TCEP、TCIPP が大きな割合を占めた。これらの検出値に

ついては、2.1.2、2.2.2.2 と同様に後述の 2.4. において初期リスク評価を行つた。

表 14 2019 年度 PFRs 測定結果 (ng/L)

地点	TEP		TPP		TBP		TPhP	
	11月	2月	11月	2月	11月	2月	11月	2月
2	3.1	4.0	N.D.	N.D.	1.5	1.7	tr(1.5)	N.D.
6B	2.5	2.3	N.D.	N.D.	0.99	tr(0.45)	tr(2.7)	N.D.
8C	3.7	2.9	N.D.	N.D.	2.2	1.0	5.8	N.D.
12B	2.0	2.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17A	2.0	1.9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	tr(1.7)	N.D.
17B	2.2	2.4	N.D.	N.D.	tr(0.53)	N.D.	tr(2.5)	N.D.
17C'	2.1	1.8	N.D.	N.D.	tr(0.49)	N.D.	tr(2.1)	N.D.
地点	TBOEP		TCEP		TCIPP		TDCPP	
11月	7.4	19	28	44	77	81	10	12
2	0.62	0.82	18	25	32	48	tr(3.7)	tr(3.7)
6B	4.6	18	58	38	53	44	tr(5.1)	tr(4.5)
8C	0.52	N.D.	15	14	40	35	tr(5.2)	tr(3.6)
12B	0.40	N.D.	15	14	31	35	N.D.	tr(3.3)
17A	0.45	N.D.	15	14	33	37	N.D.	tr(3.2)
17B	0.60	tr(0.15)	15	14	33	34	N.D.	tr(3.2)
17C'								

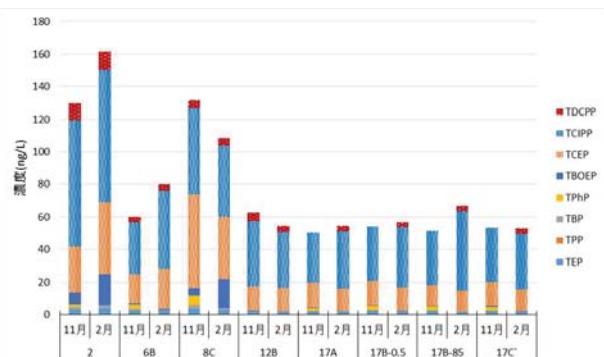


図 10 PFRs 測定結果グラフ (グラフの作成にあたり、N.D=0、tr=検出値としている、カラー図表参照)

2.4. 生態リスクの初期リスク評価

化学物質が琵琶湖等の環境水で検出された場合、追加調査等さらなる情報収集の要否を判断するための目安が必要となる。このため、琵琶湖水で検出された化学物質を対象に初期リスク評価 (生態リスク) を行った。

2.4.1. 方法

環境省が定めた「化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン（令和元年11月版）²⁾」に準拠して初期リスク評価 (生態リスク) を行った。具体的なフローを図11 に示す。水生生物 (藻類、甲殻類および魚類) に対する急性および慢性毒性データを文献検索により収集して予測無影響濃度 (PNEC) を設定し、琵琶湖水における検出濃度を予測環境中濃度 (PEC) と仮定して、PEC と PNEC を比較した。

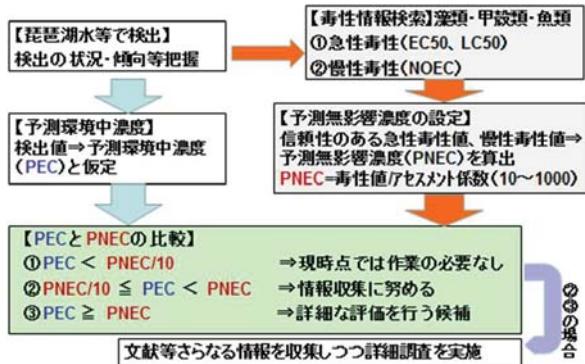


図11 初期リスク評価（生態リスク）のフロー

2.4.2. 予測無影響濃度（PNEC）の設定

第5期中期計画で調査を実施した15種類の化学物質のうち、公表資料¹¹⁻¹⁴⁾から毒性データの得られた9種類（HBCDは異性体混合物として評価）についてPNECを設定した。結果を表15に示す。

表15 PNEC 設定結果

UV-328

根拠資料 環境省生態影響試験結果一覧(平成31年3月版)

試験生物	試験方法	試験データ	試験種類	生物群	アセスメント係数	算出PNEC	採用PNEC
藻類	72h-EC50	>16μg/L	急性	3種	100	>160ng/L	160ng/L
	72h-NOEC	16μg/L	慢性	1種	100	160ng/L	
ミジンコ	48h-EC50	>83μg/L					
魚類	96h-LC50	>78μg/L					

HBCD

根拠資料 EU-RAR2008

試験生物	試験方法	試験データ	試験種類	生物群	アセスメント係数	算出PNEC	採用PNEC
ミジンコ	21d-NOEC	31μg/L	慢性	1種	100	31ng/L	31ng/L

TEP

根拠資料 GHS分類結果

試験生物	試験方法	試験データ	試験種類	生物群	アセスメント係数	算出PNEC	採用PNEC
藻類	不明	>100mg/L	不明	2種	1000	>100μg/L	>100μg/L
ミジンコ	不明	>100mg/L					

TBP

根拠資料 環境省初期リスク評価書

試験生物	試験方法	試験データ	試験種類	生物群	アセスメント係数	算出PNEC	採用PNEC
藻類	96h-EC50	2800μg/L	急性	3種	100	21μg/L	21μg/L
	72h-NOEC	3400μg/L	慢性	3種	10	103μg/L	
ミジンコ	72h-LC50	2100μg/L					
	21d-NOEC	1030μg/L					
魚類	96h-LC50	14100μg/L					
	48d-LETG	8300μg/L					

TPhP

根拠資料 環境省生態影響試験結果一覧(平成31年3月版)

試験生物	試験方法	試験データ	試験種類	生物群	アセスメント係数	算出PNEC	採用PNEC
藻類	72h-EC50	4000μg/L	急性	3種	100	13μg/L	2.5μg/L
	72h-NOEC	980μg/L	慢性	2種	100	2.5μg/L	
ミジンコ	48h-EC50	2400μg/L					
	21d-EC50	950μg/L					
	21d-NOEC	250μg/L					
魚類	96h-LC50	1300μg/L					

TBOPe

根拠資料 環境省生態影響試験結果一覧(平成31年3月版)

試験生物	試験方法	試験データ	試験種類	生物群	アセスメント係数	算出PNEC	採用PNEC
藻類	72h-EC50	63000μg/L	急性	3種	100	210μg/L	88μg/L
	72h-NOEC	8800μg/L	慢性	1種	100	88μg/L	
ミジンコ	48h-EC50	33000μg/L					
魚類	96h-LC50	21000μg/L					

TCPE

根拠資料 環境省初期リスク評価書

試験生物	試験方法	試験データ	試験種類	生物群	アセスメント係数	算出PNEC	採用PNEC
藻類	72h-EC50	212100μg/L	急性	3種	100	660μg/L	100μg/L
	72h-NOEC	72000μg/L	慢性	2種	100	100μg/L	
ミジンコ	48h-EC50	>10000μg/L					
	21d-NOEC	10000μg/L					
魚類	24h-LC50	66000μg/L					

TCIPP

根拠資料 環境保健クライテリア

試験生物	試験方法	試験データ	試験種類	生物群	アセスメント係数	算出PNEC	採用PNEC
藻類	EC50	47000μg/L	急性	2種	1000	47μg/L	47μg/L
ミジンコ	21d-NOEC	32000μg/L	慢性	1種	100	320μg/L	
魚類	96h-LC50	51000μg/L					

TDCPP

根拠資料 環境保健クライテリア

試験生物	試験方法	試験データ	試験種類	生物群	アセスメント係数	算出PNEC	採用PNEC
藻類	EC50	12000μg/L	急性	3種	1000	111μg/L	111μg/L
ミジンコ	48h-LC50	46000μg/L					
魚類	96h-LC50	1100μg/L					

2.4.3. 初期リスク評価（生態リスク）結果

2.4.3.1. ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤

2017年5月の調査において、地点6BのUV-328が17ng/L検出され、PNEC(160ng/L)の1/10を超過したため、モニタリングを継続した。その後、8月、11月、2018年2月と3回続けて当該地点では定量下限値未満であった。また、他の地点での検出値はPNECの1/10を下回るものであったため、「現時点では作業の必要なし」と判断した。

2.4.3.2. HBCD

HBCDは、 α 、 β 、 γ 各異性体の合計濃度で評価を行った。

異性体合計濃度(t-HBCD)は、2018年11月の調査における瀬田川(地点2)で0.14ng/Lであった。PNECが31ng/Lであることから、検出値はPNECの1/10を下回っており、「現時点では作業の必要なし」と判断した。

2.4.3.3. PFRs

PFRsはTPPを除く7種類が検出された。その中で、PNECとの比が最も高かったものは2019年11月の調査における地点8CでのTPhPで、PNECが2,500ng/Lに対して検出値が5.8ng/Lであることから、PNECの1/10を下回っており、「現時点では作業の必要なし」と判断した。

2.5. フェノールとアニリンの同時分析の検討

「1.はじめに」で述べたとおり、水質汚濁にかかる環境基準項目や要監視項目は増加の一途をたどっており、また近年は個別分析法が指定されることが多いことから、モニタリングを実施する地方自治体の負担が増加している。当センターではその解決法の一つとして、複数のモニタリング対象物質についての同時分析法を検討している¹⁵⁾。

水生生物保全に係る要監視項目であるフェノール・アニリンは、酸解離定数が違う等の理由により環境省の通知により個別の分析法が示されているが、分子量

や水溶解度、オクタノールー水分配係数が近いことから、有機溶媒による抽出を同時に実施できる可能性がある。

広島県が緊急時調査を想定して考案・開発を行った迅速前処理カートリッジは、水中の有機化学物質を簡易かつ迅速に分析できる有効な手法である^{16,17)}。今回、この迅速前処理カートリッジを用いたフェノール・アニリンの同時分析について検討した結果を報告する。

2.5.1. 方法

迅速前処理カートリッジは、ジーエルサイエンス株式会社から販売されているものを用いて、ジクロロメタンによる抽出を行った。

水試料 50mL にサロゲート（フェノール-d₅、アニリン-d₅ 各 50μg/mL）を 50μL、NaCl を 4.5g、ジクロロメタンを 2mL 添加し、1 分間振とうを行った。2 分間静置後、下層のジクロロメタン層をテフロン膜を固定したシリジに通液することで溶媒層を分取し、GC/MS により分析を行った（図 12）。

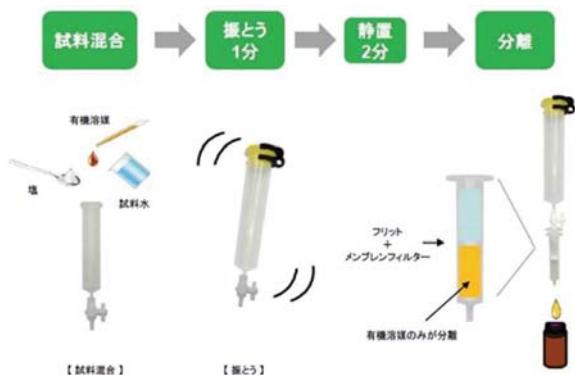


図 12 迅速前処理カートリッジによるフェノール・アニリン分析フロー

使用した試薬を表 16、GC/MS の測定条件を表 17 に示す。

表 16 フェノール・アニリン同時分析に係る使用試薬

ジクロロメタン：富士フィルム和光純薬製残留農薬試験用
塩化ナトリウム：富士フィルム和光純薬製試薬特級

表 17 フェノール・アニリン同時分析に係る GC/MS 測定条件

GC : Thermo Fisher Scientific Trace 1310
カラム : Agilent J&W DB-WAX (30m × 0.25mm i.d., 膜厚 0.25 μm)
注入口温度 : 250°C
注入量 : 1 μL
注入方式 : スプリットレス
キャリアーガス : He
流速 : 1.0mL/min
カラム温度
60°C (1min) → 5°C/min → 145°C (3min) → 10°C/min → 240°C (1.5min)
MS : Thermo Fisher Scientific ISQ-LT
イオン化法 : EI
イオン化電圧 : 70eV
イオン化電流 : 50 μA
トランスマスクーライン温度 : 250°C
イオン源温度 : 230°C
モニターイオン
フェノール m/z=94, 66
アニリン m/z=93, 66
フェノール-d ₅ m/z=99
アニリン-d ₅ m/z=98

2.5.2. 結果と考察

図 13 にフェノールの、図 14 にアニリンのクロマトグラムを示す。フェノールは、超純水を用いた操作ブランクにおいてピークが見られたが、定量値に影響を与えるような大きさではなかった。アニリンは、通常定量イオンとして用いる m/z=93 では妨害ピークが見られ、琵琶湖水に 0.001mg/L となるよう標準添加した試料においても定量値に影響が見られた。フェノールの m/z=94 においても、試料によっては妨害ピークが重なる場合があったことから、フェノール・アニリンとも m/z=66 で定量を行うこととした。

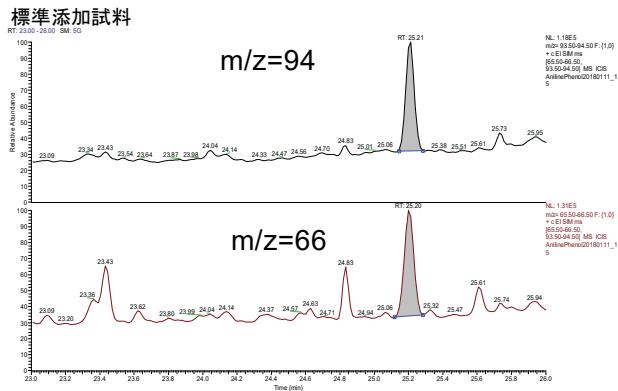
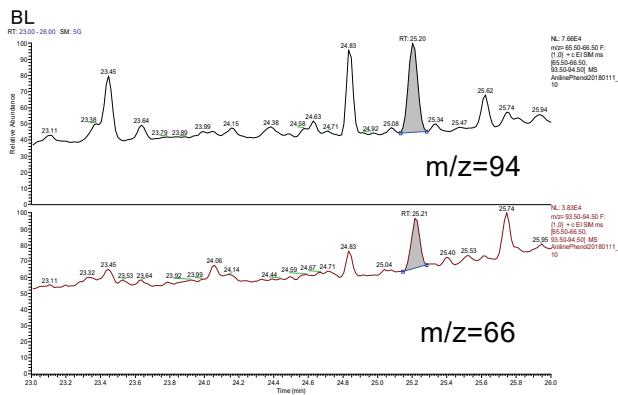


図 13 フェノールのクロマトグラム（上段：操作ブランク、下段：琵琶湖水への標準添加試料）

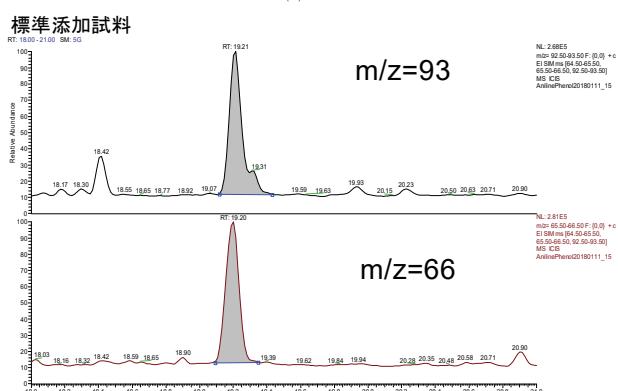
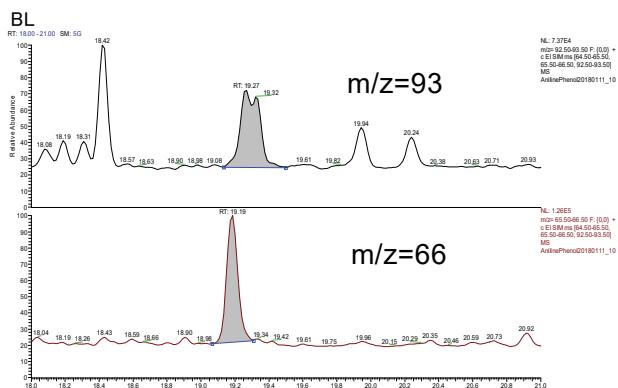


図 14 アニリンのクロマトグラム（上段：操作ブランク、下段：琵琶湖水への標準添加試料）

図15にフェノール、アニリンの検量線を示す。 $m/z=66$ を定量イオンとした場合、フェノール、アニリンともサロゲート由来のピークが見られることから、検量線の切片は0より大きくなるが、直線性は良好であった。

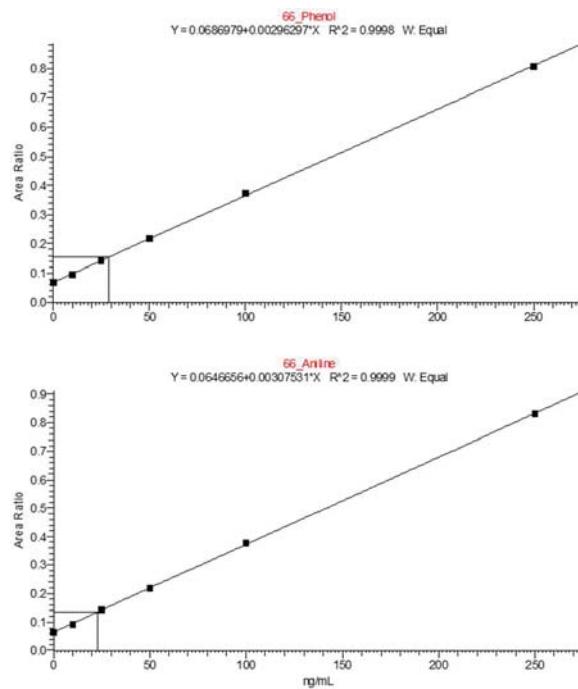


図15 フェノール(上)、アニリン(下)の検量線

この検量線を用いて、本方法における定量下限値を化学物質環境実態調査実施の手引き（平成 27 年度版）⁷⁾に基づき、繰り返し測定から算出したところ、フェノールが 0.00058mg/L、アニリンが 0.00024mg/L となり、いずれも滋賀県の公共用水域測定計画に掲げられている報告下限値（フェノール：0.001mg/L、アニリン：0.002mg/L）を下回ることができた。

2.6. まとめ

環境基準値の設定や排水規制の対象となっていない医薬品・生活由来化学物質（PPCPs）など、全国的に存在状況の把握が進められている化学物質について、分析手法を検討して確立し、試料として琵琶湖水を用いて検出実態を把握するとともに、リスク評価を行った。

ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤 4 種について第四期中期計画で確立した一斉分析法により琵琶湖水中での濃度レベルの把握を行ったところ、3 物質が検出された。

臭素系難燃剤の 1 つであり、化審法の第一種特定化学物質に指定されているヘキサブロモシクロドデカン

（HBCD）について、環境中での検出事例が多い 3 つの異性体（ α 、 β 、 γ 体）の液体クロマトグラフ質量分析装置（LC/MS）による一斉分析法を検討し、精度よく分析

できる手法を確立した。確立した分析法で琵琶湖水中での濃度レベルの把握を行ったところ、瀬田川において2つの異性体が検出された。

樹脂製品や繊維製品の難燃剤や可塑剤として広く用いられているリン酸エステル系難燃剤8種について、LC/MSによる一斉分析法を検討し、前処理装置や分析機器由来の汚染に配慮した分析法を確立した。確立した分析法で琵琶湖水中の濃度レベルの把握を行った結果、7物質が検出された。

これら（紫外線吸収剤、臭素系難燃剤、リン酸エステル系難燃剤）の物質について、環境省の「化学物質の初期リスク評価ガイドライン」に準拠して初期リスク評価（生態リスク）を行ったところ、臭素系難燃剤、リン酸エステル系難燃剤については予測無影響濃度（PNEC）の1/10未満であり「現時点では作業の必要なし」と判断した。紫外線吸収剤については、平成29年（2017年）5月にUV-328が1地点でPNECの1/10を超えたためモニタリングを継続したが、その後8月、11月、平成30年（2018年）2月と3回続けて定量下限値未満であったことから、「現時点では作業の必要なし」と判断した。

また、水生生物保全に係る要監視項目であるフェノールおよびアニリンについて、迅速前処理カートリッジを用いた同時分析法を検討した。本法の定量下限値を算出した結果、公共用水域測定計画における報告下限値を下回る値が得られた。

2.7. 結論

数多くの未規制化学物質や増え続ける法定モニタリング項目の監視に対応するため、その一部について、分析機器（GC/MS、LC/MS）を用いた一斉分析法を確立し適用することにより、琵琶湖流域における未規制化学物質に係る情報を効率的に収集・蓄積することができた。

これらの検討結果やノウハウは、法定モニタリング項目の追加時の対応等につながるものである。

今後は、これまで得られた知見や技術を第六期中期計画（R2-R4）の分析評価モニタリング3「水土壤環境の発生源モニタリング」における「特定環境追跡調査」

（環境省が実施する化学物質環境実態調査）に活用し、高度な専門知識と分析技術の蓄積や未規制化学物質の情報収集を引き続き行う予定である。

3. 生態影響試験の活用方法についての検討

生物応答を用いた生態影響試験は、個々の化学物質濃度の評価では捉えられない、未知の化学物質や複数の化学物質による影響や毒性の有無を総合的に把握・評価できる。当センターでは、「生物応答を用いた排水

試験法（検討案）」¹⁸⁾（日本版WET試験；Whole Effluence Toxicity、以下「WET試験」という。）に準じて試験を行ったので、その結果について報告する。

WET試験は、排水が生態系に与える影響を魚類、甲殻類、藻類などの水生生物を用いた毒性試験により、総合的に評価する試験方法である。欧米では1990年代に水質規制に導入され、アジアでは韓国が2011年に導入した。現在、日本では、環境法令における排水規制や環境基準項目の水質評価は、個々の化学物質濃度を定量し、基準値と比較することとなっている。

しかし、排水や環境水中には複数の化学物質が含まれており、前述の評価方法では、これらの複合的な影響が把握できず、課題の一つとなっている。そこで、環境省においてWET試験の導入が検討されていたところである。

検討されていた方法は、生物の生死で毒性を判断するのではなく、生物が繁殖し次世代まで生き続けることができるかを確認することで、より低濃度の毒性影響を評価できると期待されている試験方法である。

当センターでは、WET試験の標準化や体制の確立に貢献するため、II型共同研究（「WET手法を用いた水環境調査のケーススタディ」、2016～18年度）に参画し、魚類（ゼブラフィッシュ、図16）に係る環境水を用いたWET試験を実施した。

WET試験の有効性を実証するため、試験生物である魚類（ゼブラフィッシュ）の飼育・培養方法を検討し、当センターでの飼育技術・継代培養方法を確立した。さらに、当センターにおいて環境基準の定められている物質を用いてWET試験を実施し、これらの物質が水生生物に与える影響について調査を行った。



図16 ゼブラフィッシュ（上：メス、下：オス）

3.1. 試験方法・結果

本研究において、ゼブラフィッシュを用いた胚・仔魚期（図17）における短期毒性試験を行った。この試験法は、産卵後間もない受精卵を試験水に暴露し、その後の成長の様子を観察する。死亡、孵化の遅れ、遊泳阻害等の影響を指標とし、試験水の生物影響を評価した。試

験条件を表 18 に示す。

表 18 ゼブラフィッシュを用いた胚・仔魚期における短期毒性試験条件

試験方式：半止水式

試験期間：約 9 日間

試験濃度：3~5 濃度区、公比 2

生物数：40 卵/濃度区(各濃度区 10 卵×4 連)

試験温度：26±1°C

照明：16h 明/8h 暗の周期

給餌：なし



図 17 ゼブラフィッシュの胚（左）・仔魚（右）

3.1.1. 環境基準値との比較

環境基準値の定められている物質が、水生生物に対して与える影響を調査するため、これらの物質を対象として短期毒性試験を行った。

対象物質には、人の健康の保護に係る環境基準が設定されたふっ素、ほう素、硝酸態窒素および、河川・湖沼における水生生物保全のための環境基準が設定された亜鉛を選定した。

なお、ふっ素、ほう素、亜鉛の 3 物質は、PRTR 制度に基づく届出において、本県で公共用水域への排出量の上位を占めている。

ふっ素および亜鉛を用いた試験結果をそれぞれ図 18、図 19 に示す。

ふっ素（環境基準 0.8mg/L）については、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2mg/L の 5 濃度区で試験を実施した。その結果、すべての濃度区においてふ化・生存は正常であり、3.2mg/L の濃度区においても対照区との有意差は認められなかったことから、ふっ素の最大無影響濃度（NOEC）は環境基準値の 4 倍以上と判断された。

亜鉛（環境基準 0.03mg/L）については、2、1、0.5、0.25、0.125mg/L の 5 濃度区で試験を実施した。その結果、1mg/L の濃度区でふ化率に対照区と比較して有意な差が認められたことから、NOEC は 0.5mg/L（環境基準の 17 倍程度）と判断された。

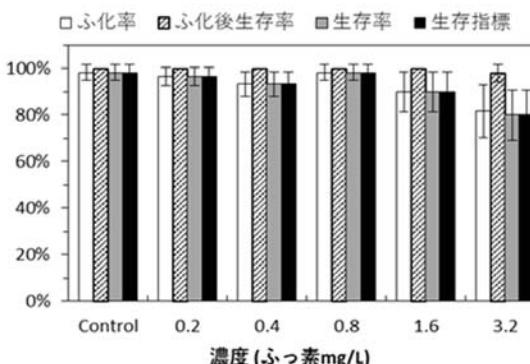


図 18 胚・仔魚期のゼブラフィッシュを用いた試験（WET 試験）の結果（ふっ素）

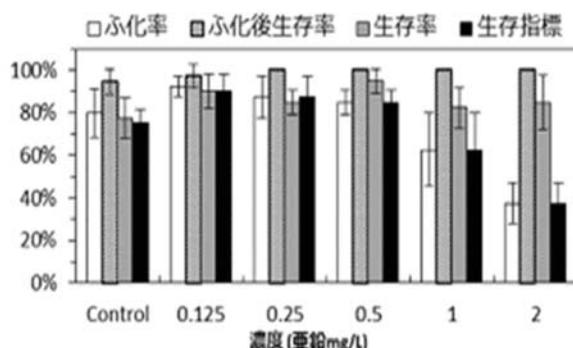


図 19 胚・仔魚期のゼebraフィッシュを用いた試験（WET 試験）の結果（亜鉛）

3.1.2. 物質の複合暴露による影響の調査

次に、複数物質が暴露した際の水生生物への影響を調査するため、単独では無影響な程度の物質を複合暴露させ、NOEC の値が低下するかどうかについて調査を行った。

本研究では、単独では無影響な程度のふっ素およびほう素を複合暴露させ、亜鉛の NOEC が低下するかどうかについて調査した。

亜鉛の濃度は 2.1.1 と同様とし、そこに 0.16mg/L（環境基準の 2 倍）のふっ素を複合暴露させた結果を図 20 に示す。亜鉛の濃度が 2mg/L の濃度区でふ化率に対照区と比較して有意な差が認められたことから、NOEC は 1mg/L と判断され、物質の複合暴露による NOEC の低下は認められなかった。

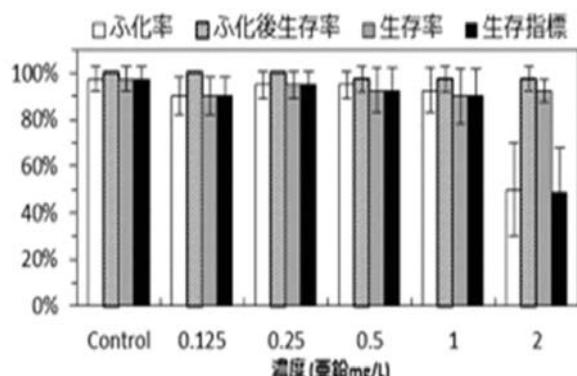


図 20 胚・仔魚期のゼブラフィッシュを用いた試験 (WET 試験) の結果 (亜鉛にふつ素 (0.16mg/L) を複合暴露)

3.1.3. 塩の影響の調査

事業場排水においては中和処理を行うことにより塩濃度が上昇することが予想されるため、代表的な塩類である塩化ナトリウムを用いて影響を調査した。

25mmol/L の塩化ナトリウム (単独では無影響な程度) を、2.1.2 と同様に亜鉛に複合暴露させ、亜鉛の NOEC が低下するかどうかについて調査した。その結果を図 21 に示す。亜鉛の濃度が 1mg/L の濃度区でふ化率に対照区と比較して有意な差が認められたことから、NOEC は 0.5mg/L と判断され、塩の複合暴露による NOEC の低下は認められなかった。

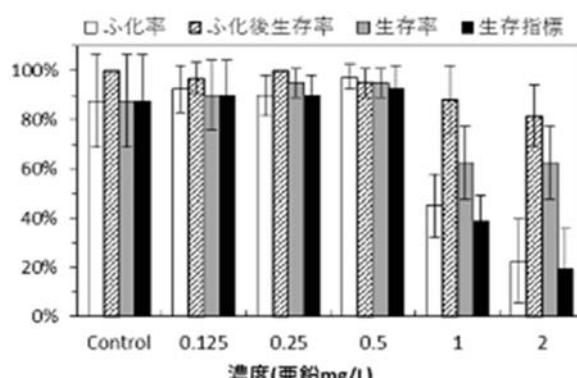


図 21 胚・仔魚期のゼブラフィッシュを用いた試験 (WET 試験) の結果 (亜鉛に塩化ナトリウム (25mmol/L) を複合暴露)

3.1.4. 環境水を用いたⅡ型共同研究

Ⅱ型共同研究において、環境水 (河川水) を用いた同一試料による試験を実施した。濃度区は河川水の 80、40、20% 希釀の 3 濃度区とした。2018 年度の試験結果を図 22 に示す。すべての濃度区においてふ化・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 NOEC は 80% 以上と判断された。この結果について、他の試験機関と同様の結果であり、異

なる施設間での再現性を確認した。このことから当センターにおける飼育方法および短期毒性試験の技術確立と、試験精度の確認ができた。

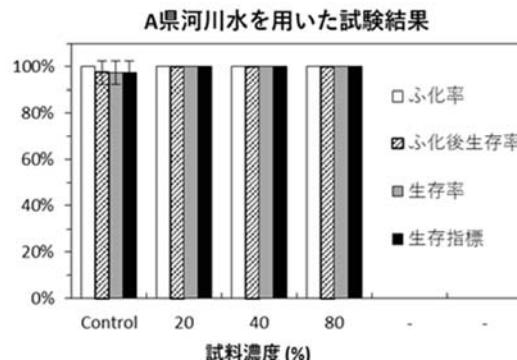


図 22 胚・仔魚期のゼブラフィッシュを用いた試験 (WET 試験) の結果 (河川水)

3.2. まとめ

生物応答を用いた排水試験法 (検討案) に準じて、胚・仔魚期の魚類を用いた排水管理試験 (WET 試験; Whole Efficient Toxicity) を実施するため、試験生物である魚類 (ゼブラフィッシュ) の飼育・継代培養を行った。

水質汚濁防止法に定める有害物質であるほう素、ふつ素、硝酸態窒素の 3 物質を対象として試験を実施した。その結果、いずれの物質においても、環境基準の約 4 倍程度において影響がみられないことを確認した。

亜鉛と、単独では無影響な程度のほう素およびふつ素 (いずれも環境基準の 2 倍程度) を複合暴露させて試験を実施し、亜鉛を単独で暴露させた際の結果と比較して、複合影響の有無を調査した。その結果、亜鉛を単独で暴露させた際に影響のない最大の濃度は、河川及び湖沼における水生生物保全環境基準の数十倍程度と算出された。亜鉛にはう素やふつ素を複合させて同様に試験を行った結果、複合影響は確認されなかった。

事業場排水においては中和処理を行うことにより塩濃度が上昇することが予想されるため、代表的な塩類である塩化ナトリウムを用いて影響を調査した。亜鉛に、単独では無影響な程度の塩化ナトリウムを複合暴露させて試験を実施した結果、複合影響は確認されなかった。

WET 手法を用いた水環境調査のケーススタディに関する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、同一試料を用いて WET 試験を実施した。得られた結果は他機関と同様のものであった。このことから、当センターの試験精度の確認ができた。

ゼブラフィッシュを用いた WET 試験は、胚・仔魚期の魚を用いることから、成魚を交配させ産卵させる必要があり一定の技能と生物の確保が必要である、試験

実施に 9 日程度要する等、試験の導入にあたっての課題があることが分かった。

3.3. 結論

ゼブラフィッシュを用いた WET 試験について、試験法に係るノウハウを獲得し、当センターで実施できるようになった。Ⅱ型共同研究により、試験精度の確認についても行うことができた。しかしながら、WET 試験の実施にあたっては、一定の技能と生物の確保が必要であり、試験実施に 9 日程度要する等、試験の導入にあたっての課題があることが分かった。

試験魚（ゼブラフィッシュ）の飼育・継代培養に関する知見や技術を得ることができた。今後、これら的一部については、第六期中期計画の調査解析 4 サブテーマ 2（魚類を用いた急性毒性試験による緊急時調査手法の検討）へとつなげていくこととする。

4. 緊急事故対応のための基盤構築

事業場等では多岐にわたる化学物質が使用されており、化学物質の数も年々増加している。これらの化学物質が流出するリスクは、人為ミスや自然災害等により発生し、自然環境や社会生活に大きな影響を与えることが懸念される。

過去には、平成 24 年 5 月利根川水系にヘキサメチレンテトラミン（HMT）が流出し、取水された原水の浄水処理によってホルムアルデヒドが水道水質基準を超過した事例¹⁹⁾や滋賀県内でも工場からの化学物質の漏えいによる 10 日間の断水を引き起こした水質事故²⁰⁾等の事例がある。近年においても化学物質の流出等による水質苦情件数の減少傾向は見られず²¹⁾、緊急時における速やかな原因究明や影響確認に資する手法の強化が必要とされている。

このような緊急事故時の環境面での危機管理の対応として、緊急事故時の原因究明や環境等への影響確認に資する手法の検討を行った。

4.1. LC/MS データベースライブラリの作成

緊急事故発生時には、迅速な原因物質の同定、影響範囲の確認および終息後の安全確認が必要となる。

緊急事故時の化学物質分析には、汎用性とともに長年の経験と実績からガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）を用いることが多いが、本研究では、水質分析において前処理が比較的容易で、対象物質の揮発性や熱分解性をあまり考慮せずに、迅速な測定が可能な液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS）を用いて検討を行うこととした。

事業場等からの化学物質流出事故を想定し、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た。さらに簡易な前処理（測定試料の調製）

のみで LC/MS 分析が可能な測定対象物質を選定し、LC/MS を用いた一斉分析法を検討した。

4.1.1. 方法

測定対象候補物質の選定を図 23 に示す。PRTR 制度の届出データ²²⁾から、県内または全国で排出・移動量の報告実績があり、LC/MS で測定可能な物質である 19 物質を抽出した（表 19）。2-イミダゾリジンチオン、m-アミノフェノール、2, 4-di-tert-ブチルフェノールの 3 物質は、県内では実績報告はないが全国での排出・移動量が多い物質である。



図 23 測定対象候補物質の選定

表 19 測定対象物質

ネガティブモード	定量分析目標濃度 ($\mu\text{g/L}$)	ポジティブモード	定量分析目標濃度 ($\mu\text{g/L}$)
直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩 (LAS:C10~C14)	5	アニリン	50
4-ヒドロキシ安息香酸メチル	600	アクリルアミド	1000
4-n-オクチルフェノール	0.8	ヘキサメチレンテトラミン(HMT)	60
4-tert-ブチルフェノール	51	N, N-ジメチルアセトアミド	5000
2,4-di-tert-ブチルフェノール	6.8	チオ尿素	1100
ビスフェノールA	46	4, 4'-メチレンジアニリン	206
		4, 4'-ジアミノジフェニルエーテル	520
		ジフェニルアミン	38
		ベンゾフェノン	100
		ビス(1-メチル-1-エコキシド)=ペルオキシド (DCPO)	4.7
		m-アミノフェノール	1210
		2-イミダゾリジンチオン	18000
		ポリ(オキシエチレン)=ノルフレニルエーテル	10

事故時に最初に表面化する事象の一つとして、魚類のへい死が挙げられることから、分析可能な濃度レベルの設定を魚類の急性毒性値から設定することとし、事故後の安全確認の目安として魚類の急性毒性値^{11, 23-32)}の 100 分の 1 を定量分析目標濃度とした。ただし、浄水処理困難物質である HMT は塩素処理によるホルムアルデヒド生成が問題であり、ホルムアルデヒドの水道水質基準である $80 \mu\text{g/L}$ を生成させる HMT の濃度($60 \mu\text{g/L}$)を定量分析目標濃度とした。（表 19）

緊急事故時の分析には迅速性が求められるため、環境水からの測定試料の調製を行うための前処理には、ADVANTEC 社製メンプランフィルター（以下、フィルター）を用いたろ過操作のみを基本として検討を行った。

分析条件は、文献等³³⁻⁴¹⁾を参考に、ESI-Negative (6 物質) と ESI-Positive (13 物質) に分けて、それぞれ測定条件の検討を行い、環境省「化学物質環境実態調査

実施の手引き⁷⁾に準じ、定量下限値（MQL）を求め、添加回収試験を実施した。

試料は琵琶湖水（南湖・北湖）、河川水（野洲川）を用いた（図 24）。図 25 に、標準溶液のクロマトグラムの一部を示す。

使用した試薬および LC/MS の機器を表 20 に示す。

表 20 LC/MS データベースライブラリ作成に用いた使用試薬、機器

使用試薬：メタノール（富士フィルム和光純薬製 LC/MS 用）

使用機器

LC : Waters Acquity UPLC H-Class

MS : AB SCIEX TRIPLE QUAD4500



図 24 試料採取地点

出典：独立行政法人水資源機構 琵琶湖開発総合管理所；琵琶湖・淀川からの給水エリア。（加工追記）

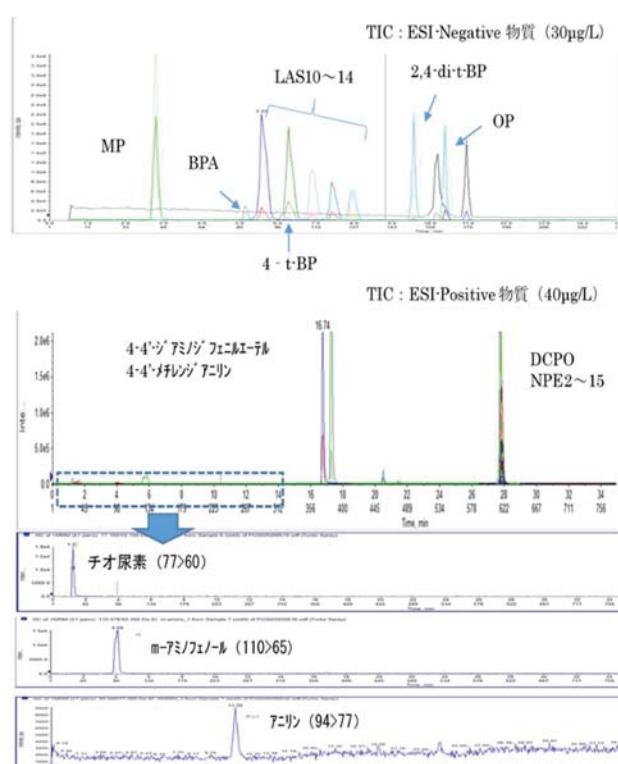


図 25 測定対象物質標準混合溶液の LC/MS クロマトグラム

4.1.2. 結果と考察

測定試料の調製フローを図 26 に示す。

測定対象試料に等量のメタノールを加えて、試料の 50% メタノール水溶液を調製する。次にメタノール洗浄したガラス製シリンドリ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。そして試料の 50% メタノール水溶液 1mL をろ過する。最後にフィルターを 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。

試料調製操作では、いくつかの物質についてフィルター等への吸着が確認されたため、試料にメタノールを等量添加して 50% メタノール水溶液とすることでその影響を軽減することができた。また、ろ過後の 50% メタノール水溶液による洗浄は、洗浄量が多いほど回収率は良くなつたが、分析方法の定量下限値（MQL）を考慮して許容できる最少の量とした。

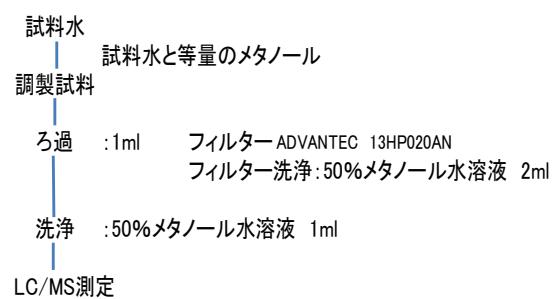


図 26 試料調製方法

MQL および添加回収試験結果を表 21 に、ESI-Negative (6 物質) の測定条件を表 22 および ESI-Positive (13 物質) の測定条件を表 23 に示す。

表 21 MQL、添加回収試験結果

物質名	分析 条件	測定結果	
		MQL ($\mu\text{g/L}$)	添加回収試験 回収率(%)
LAS	①	C10	0.2
		C11	0.7
		C12	1.9
		C13	1.3
		C14	0.1
		4-ヒドロキシン安息香酸メチル	1.1
		4-n-オクチルフェノール	0.1
		4-tert-ブチルフェノール(4-t-BP)	5.0
		2,4-di-tert-ブチルフェノール	3.8
		ビスフェノールA	0.5
アニリン	②	アクリルアミド	33
		ヘキサメチレンテトラミン(HMT)	1.7
		N, N-ジメチルアセトアミド	4.7
		チオ尿素	66
		4, 4'-メチレンジアニリン	17
		4, 4'-ジアミノジフェニルエーテル	0.2
		ジフェニルアミン	0.3
		ベンゾフェノン	38
		ビス(1-メチル-1-フェニルエチル)=ペルオキシド	12
		m-アミノフェノール	20
ポリ(オキシエチレン)=ノニルフェニルエーテル	③	2-イミダゾリジンチオン	3.9
		NPE2	7.8
		NPE3	5.4
		NPE4	0.62
		NPE5	0.47
		NPE6	0.20
		NPE7	0.17
		NPE8	0.16
		NPE9	0.29
		NPE10	0.21
		NPE11	0.15
		NPE12	0.29
		NPE13	0.16
		NPE14	0.29
		NPE15	0.46

表 22 分析条件①

カラム	YMC 製 Triart C18 (2.0 x 100mm ,1.9um)
移動相	A:超純水 B:メタノール
LC条件	
グラジェント条件	
0→9min	A:50→5%、B:50→95%
9→14min	A:B=5:95
14→20min	A:B=50:50
MS条件	
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
Colision Gas	7
IonSpray Voltage	-3500
Desolvation Temperature	600°C

表 23 分析条件②

カラム	Waters 製 HSS T3 (2.1 x 100mm ,1.8um)
移動相	A:超純水 B:メタノール C:100mM 酢酸アンモニウム
LC条件	
グラジェント条件	
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
MS条件	
イオン化法	ESI-Positive
Curtain Gas	30psi
Colision Gas	8
IonSpray Voltage	5500V
Desolvation Temperature	500°C

ESI-Negative は、いずれも定量分析目標濃度を満足し、添加回収率も 4-t-BP 以外では 74~124% と良好な結果が得られた。4-t-BP の回収率は 144~162% とやや高いが、緊急事故時に使用する想定であるため、許容範囲と判断している。

LAS は C12、C13 のプランク値が高く、実験室内でのコンタミネーションが確認された。測定開始前にはプランク値を確認し、分析に支障がない程度までプランクを低減する必要があった。

ESI-Positive では、添加回収率は 78~130% と良好な結果が得られたが、定量分析目標濃度は、ビス (1-メチル-1-フェニルエチル) =ペルオキシド (DCPO) のみ満足できなかったため、表 24 のとおりグラジェント等の条件を改良した結果、定量分析目標濃度を満足した。

表 24 分析条件③

カラム	Waters 製 HSS T3 (2.1 x 100mm ,1.8um)
移動相	A:超純水 B:メタノール C:100mM 酢酸アンモニウム
LC条件	
グラジェント条件	
0→12min	A:B:C=92.5:5:2.5
12→15min	92.5→32.5%、B:5→65%、C:2.5→2.5%
15→24min	A:B:C=32.5:65:2.5
24→35min	A:B:C=2.5:95:2.5
35→45min	A:B:C=92.5:5:2.5
カラム流量	0.3mL/min
カラム温度	40°C
注入量	10 μL
MS条件	
イオン化法	ESI-Positive
Curtain Gas	30psi
Colision Gas	8
IonSpray Voltage	5500V
Desolvation Temperature	500°C

以上により、対象物質に選定した 19 物質全てについて、当初設定した定量分析目標濃度を満足できる分析条件が得られたことから、図 24 に示す地点で 2019 年 2 月に採水した琵琶湖水（南湖、北湖）、河川水（野洲川）の実試料を用いて測定したところ、対象物質 19 物質すべてがいずれも MQL 未満であった。

4.1.3. まとめ

災害・事故等における調査対象物質として、事業場等からの流出事故を想定し、PRTR 制度に基づく化学物質の移動排出量のデータをもとに、滋賀県および全国での移動・排出量が多い物質を抽出し、その中から LC/MS で測定可能な物質を選定した。

定量分析目標濃度に魚類の急性毒性値の 100 分の 1 の値を設定した。

試料水に、琵琶湖水、河川水を用いて迅速性を優先してカートリッジ型の迅速前処理フィルターを用いた試料調製方法の検討を行った。フィルターの使用条件について検討を行い、フィルターへの吸着により測定不可能な物質は測定対象から除外した。

LC/MS 分析条件の検討を行い、一斉分析可能な物質について定量下限値（MQL）を求め、添加回収試験を実施した。19 物質において良好な結果が得られ、定量分析目標濃度を満足して測定できることを確認した。

試料水の琵琶湖水、河川水ともにすべての物質で MQL 以下であった。

19 物質について迅速な測定に成功したことから、今後は対象物質を増やすとともに、全国の情報を収集するなどにより、緊急時により幅広く活用できるよう手法の改良を進める。

4.2. ゼブラフィッシュによる急性毒性試験の検討

万が一、化学物質の水環境中への流出事故が発生した場合には、自然環境や社会生活に大きな影響を与えることから、原因究明や影響確認を速やかに実施することが求められる。しかしながら、機器分析だけでは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。

国立環境研究所と地方環境研究所においては、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」（2019 年度～2021 年度）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（図 27）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。



図 27 ゼブラフィッシュの急性毒性試験
(上：生存、下：致死)

4.2.1. 試験方法・結果

OECD テストガイドライン No. 203 「魚類急性毒性試験」(1992 年)に準じて試験を実施し、試験条件は表 25、測定・評価方法は以下のとおりとした。

表 25 ゼブラフィッシュによる急性毒性に係る試験条件

試験方式	止水式
試験期間	96 時間
試験濃度	3～5 濃度区、公比 2
	なお、必要に応じて助剤対照区を設けた。
生物数	1 濃度区につき 7 尾
試験温度	26 ± 1°C
照明	16h 明 / 8h 暗の周期
給餌	なし

【測定・評価】

暴露開始直後、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 時間ごとに測定した。

暴露開始から 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。

4.2.1.1. ヒメダカとゼブラフィッシュ稚魚の結果比較

当センターではヒメダカを用いた急性毒性試験の実施技術を確立してきたところであるが、ゼブラフィッシュはヒメダカと比較して飼育・継代が容易であることから、ヒメダカとゼブラフィッシュ稚魚の感度比較を行った。対象物質は、リン酸エステル系難燃剤 3 物質 (TPP, TBOEP, TDCPP)とした。このうち TBOEP (リン酸トリス(2-ブトキシエチル)) の構造図を図 28 に示す。リン酸エステル系難燃剤は、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(化審法)において使用が禁止された臭素系難燃剤の代替として、繊維製品やプラスチック製品等に幅広く使用されている⁴²⁾。しかし、当該物質は神経毒性を有すると疑われている^{43, 44)}ことから、流出事故等の緊急の際に水生生物に与える影響を調べるために、対象物質として選定した。なお、当該物質は水に溶けにくいため、アセトンを助剤として使用し、助剤による魚への影響の有無を調べるために助剤対照区を設けた。

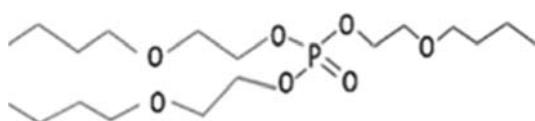


図 28 リン酸トリス(2-ブトキシエチル)の構造式

この結果、両者の LC50-96h は表 26 のとおりとなり、また助剤による影響は認められなかった。両者の LC50-96h に 2 倍を超えるような差がないことから、それぞれに大きな感度の差はないものと考えられた。

表 26 ヒメダカとゼブラフィッシュ稚魚の LC50

	LC50-96h	TPP	TBOEP	TDCPP
ヒメダカ	54.6mg/L	17.7mg/L	2.0mg/L	
ゼブラフィッシュ稚魚	84.6mg/L	17.7mg/L	2.3mg/L	

4.2.1.2. ゼブラフィッシュの大きさによる結果比較

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)を用いて急性毒性試験を実施し、魚の大きさによって感度に差がみられるかを調査した。

- ①体長約 3cm、ふ化後 1 年程度
- ②体長約 2cm、ふ化後数ヶ月程度
- ③体長約 0.5cm、ふ化後 2 週間程度

また、対象物質にはリン酸エステル系難燃剤の一種である TBOEP を使用し、3.2.1.2 と同様に助剤対照区を設けて試験を実施した。

この結果、①～③の魚の LC50-96h は表 27 のとおりとなり、また助剤による影響は認められなかった。①～③の LC50-96h に 2 倍を超えるような差がないことから、それぞれに大きな感度の差はないものと考えられた。

表 27 ①～③の LC50

	①(3cm)	②(2cm)	③(0.5cm)
LC50-96h	17.7mg/L	17.7mg/L	12.5mg/L

4.2.1.3. 環境水を用いた II 型共同研究

II 型共同研究において、環境水(河川水)を用いた同一試料による試験を実施した。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。2019 年度の試験結果について、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。

4.2.2. まとめ

急性毒性試験を実施するため、試験生物である魚類(ゼブラフィッシュ)の飼育・継代培養を行った。

リン酸エステル系物質の一種であるリン酸トリス(2-ブトキシエチル) (TBOEP) について、大きさの異なる 3 種類のゼブラフィッシュを用いて急性毒性試験を実施し、大きな感度の差がないことを確認した。

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。

これらの知見を基に、急性毒性試験対応マニュアルの試案を作成した。急性毒性試験は、成魚を用いることから技術的に容易で短期間(5 日間程度)での評価が可能であり、水質事故等緊急時の安全確認に適していることが分かった。

4.3. 結論

機器分析を用いた一斉分析法について、緊急時に活用できるよう検討を行った。事業場等からの化学物質の流出を想定し、PRTR データに基づいて選定した物質において、LC/MS を用いた分析方法を確立できた。化学物質は多岐にわたることから、より多くの化学物質に対応するために、当センター所有の分析機器（GC/MS、LC/MS）を用いて検討を進める必要がある。

ゼブラフィッシュを用いた急性毒性試験は、技術的容易性や迅速性の観点から水質事故発生等の緊急時における安全確認に適していることが分かった。そのため、急性毒性試験の基盤構築を進め、緊急時の対応も一定可能となった。今後も試験方法の改良等を行う。

今後は、第六期中期計画（R2-R4）の「緊急時における化学物質調査手法の検討（調査解析 4）」において、以下の内容に取り組むこととしている。

- ・災害時等の緊急調査を想定したⅡ型共同研究「GC/MS による化学物質の網羅的簡易迅速測定法の開発」（令和元年度（2019 年度）～）に参画し、共同研究を行う機関との情報共有を図りながら、対象物質を増やしていく予定である。

- ・第五期中期計画（H29-R1）で作成した急性毒性試験対応マニュアル（試案）の改訂や、確立された分析手法を整理するなど、より実用的なものにしていく予定である。

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. 生態影響試験の活用方法についての検討」および「4.2. ゼブラフィッシュによる急性毒性試験の検討」とこれに関連する部分を生物圏係が担当し、他の部分を化学環境係が担当した。

6. 引用文献

- 1) 環境省(2020)：報道発表資料「水質汚濁に係る人の健康の保護に関する環境基準等の見直しについて」（第5次答申）について
<http://www.env.go.jp/press/108066.html>
- 2) 環境省(2019)：化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン（令和元年11月版）
<http://www.env.go.jp/chemi/report/ierac18/1-2.pdf>
- 3) 桐山徳也、津田泰三、佐貫典子、宮下康雄、河原晶、居川俊弘、中村光穂、古田世子、池田将平、一瀬諭、瀧野明彦、藤森匠、卯田隆(2017)：化学物質の影響把握と総量リスク評価手法の検討、滋賀県琵琶湖環境科学研究所研究報告書、13：

183-202

- 4) 滋賀県(2019)：令和2年度公共用水域・地下水水質測定計画
<https://www.pref.shiga.lg.jp/file/attachment/5167511.pdf>
- 5) 独行政法人製品評価技術基盤機構、厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室(2013)：製品含有化学物質のリスク評価
https://www.nite.go.jp/chem/risk/products_risk-hbcd.pdf
- 6) 西野貴裕、加藤みか、木村匠汰、下間志正(2014)：第17回水環境学会シンポジウム講演集：97-98
- 7) 環境省(2015)：化学物質環境実態調査実施の手引き（平成27年度版）
- 8) 松神秀徳、戸館侑孝、Sico H. Brandsma, Pim E. G. Leonards, 滝上英孝(2014)：リン酸エステル系難燃剤の定量分析法の開発と国際相互検定による検証、環境化学、24(2)：41-49
- 9) 山崎隆博、吉川昌範(2017)：福井県内の河川におけるリン酸エステル系難燃剤の実態について、福井県衛生環境研究センタ一年報、16：57-59
- 10) 宮尻久美、坂雅宏(2019)：リン酸エステル系難燃剤分析法の精度と京都府南部河川水を試料とした本法の適用結果について、京都府保環研年報、64：24-29
- 11) 環境省(2002)：化学物質の環境リスク評価 第1巻
<http://www.env.go.jp/chemi/report/h14-05/index.html>
- 12) 環境省(2005)：化学物質の環境リスク評価 第4巻
<http://www.env.go.jp/chemi/report/h17-21/index.html>
- 13) 環境省(2018)：生態影響試験（藻類、甲殻類、魚類）結果一覧（平成31年3月版）
[http://www.env.go.jp/chemi/y052-\[24\]/mat2_3103.pdf](http://www.env.go.jp/chemi/y052-[24]/mat2_3103.pdf)
- 14) 国立医薬品食品衛生研究所：環境保健クライテリア（EHC）日本語抄訳
<http://www.nihs.go.jp/hse/ehc/>
- 15) 藤森匠、佐貫典子、桐山徳也、河原晶、津田泰三、中村光穂、卯田隆(2016)：LC/MS/MS によるアルキルフェノール類等の一斉分析法の検討について、第50回日本水環境学会年会講演要旨集：P-J06
- 16) 木村淳子、大原俊彦、横本佳泰(2014)：環境水中の農薬等分析のための迅速前処理法の開発、全国環境研会誌、39(1)：49-54

- 17) 横本佳泰、木村淳子、大原俊彦(2017) : 環境水中の有機化学物質分析における迅速前処理法の検討, 第 26 回環境化学討論会要旨集 : P-095
- 18) 排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会(2015) : 生物応答を用いた排水試験法（検討案）
- 19) 厚生労働省(2013) : 水道水源における消毒副生成物前駆物質汚染対応方策検討会（平成 25 年）, 平成 24 年 5 月に発生した利根川水系における水質事故参考資料 1
https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kentoukai/dl/s_sankou01.pdf
- 20) 厚生労働省 : 水道関連事故事例について（平成 14 年度以前）
<https://www.miw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/sido/jouhouaccident14.html>
- 21) 滋賀県(2018) : 滋賀県平成 30 年度（2018 年）統計書、第 21 章
<https://www.pref.shiga.lg.jp/kensei/tokei/ruinen/300011.html>
- 22) 経済産業省(2015) : 届出排出量及び移動量並びに届出外排出量の集計結果について（平成 25 年度排出分）
https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/law/prtr/h25kohyo/shukeikekka_csv.html
- 23) 環境省(2003) : 化学物質の環境リスク評価 第 2 卷
<http://www.env.go.jp/chemi/report/h15-01/index.html>
- 24) 環境省(2004) : 化学物質の環境リスク評価 第 3 卷
<http://www.env.go.jp/chemi/report/h16-01/index.html>
- 25) 環境省(2006) : 化学物質の環境リスク評価 第 5 卷
http://www.env.go.jp/chemi/report/h18-12_index.html
- 26) 環境省(2007) : 化学物質の環境リスク評価 第 6 卷
<http://www.env.go.jp/chemi/report/h19-03/index.html>
- 27) 環境省(2008) : 化学物質の環境リスク評価 第 7 卷
<http://www.env.go.jp/chemi/report/h21-01/index.html>
- 28) 環境省(2010) : 化学物質の環境リスク評価 第 9 卷
<http://www.env.go.jp/chemi/report/h23-01/index.html>
- 29) 環境省(2014) : 化学物質の環境リスク評価 第 13 卷
<http://www.env.go.jp/chemi/report/h27-01/index.html>
- x.html
- 30) 環境省(2016) : 化学物質の環境リスク評価 第 15 卷
<http://www.env.go.jp/chemi/report/h29-01/index.html>
- 31) 環境省(2018) : 化学物質の環境リスク評価 第 17 卷
<http://www.env.go.jp/chemi/report/ierac17/index.html>
- 32) 環境省(2019) : 化学物質の環境リスク評価 第 18 卷
<http://www.env.go.jp/chemi/report/ierac18/index.html>
- 33) 環境省(2004) : 化学物質分析法開発調査報告書(平成 16 年度（修正追記版）) : 109-137
- 34) 環境省(2005) : 化学物質分析法開発調査報告書(平成 17 年度（修正追記版）) : III - 181-191
- 35) 環境省(2006) : 化学物質分析法開発調査報告書(平成 18 年度（修正追記版）) : 842-857
- 36) 環境省(2007) : 化学物質分析法開発調査報告書(平成 19 年度（修正追記版）) : 872-887, 972-993, 994-1008, 1282-1300
- 37) 環境省(2008) : 化学物質分析法開発調査報告書(平成 20 年度（修正追記版）) : 394-410
- 38) 環境省(2012) : 化学物質分析法開発調査報告書(平成 24 年度（修正追記版）), : 510-530
- 39) 環境省(2013) : 化学物質分析法開発調査報告書(平成 25 年度（修正追記版）) : 779-793
- 40) 環境省(2015) : 化学物質分析法開発調査報告書(平成 27 年度（修正追記版）) : 807-850
- 41) 環境省(2013) : 要調査項目等調査マニュアル(平成 25 年 3 月)利根川水系における水質分析法検討業務
http://www.env.go.jp/water/chosa/h25-03_tonegawa.pdf
- 42) 斎藤育江、大貫文、瀬戸博(2001) : 有機リン酸トリエステル類の室内及び外気濃度測定, エアロゾル研究, 16(3) : 209
- 43) Sprague, G. L., Sandvikk L. L., Brookins-Hendricks, M. J., et al. (1981): Neurotoxicity of two organophosphorus ester flame retardants in hens , Journal of Toxicology and Environmental Health, 8, 507-518
- 44) Weiner, M. L., Jortner, B. S. (1999): Organophosphate-Induced Delayed Neurotoxicity of Triarylphosphates, Neurotoxicology, 20, 653-673