

緊急時における化学物質調査手法の検討

環境監視部門 化学環境係 佐貫典子、居川俊弘、井上健、七里将一、河原晶、田村隆真
生物圏係 萩原裕規、藤原直樹、池田将平、宮下康雄

1. 目的

令和4年(2022年)2月現在で2億6千万以上の化学物質にCAS登録番号が登録付与されており、日毎に増加している。また、頻発する自然災害や人為ミスによるこれらの流出事故の発生リスクも高まり、流出物質の性質により自然環境や社会生活に与える影響の大きさやその対処方法も大きく異なる。そのため、流出等による影響の原因物質の同定分析の重要性が再認識されてきている。

迅速な原因物質の究明と、適切な環境リスク評価を行うことにより、的確な対応を迅速に図れ、結果として環境影響を最小限にすることが可能となる。

そのため、多くの緊急事故時のケースに対応できるように、原因物質究明の機器分析と、周辺環境への安全性確認等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実施してきている。

なお、機器分析では、対象とする化学物質の性質によって適する分析装置が異なるため、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)を用いて、物質同定と簡易定量手法の検討を進めている。

2. 研究内容と結果

【サブテーマ①：機器分析による化学物質の緊急時調査手法の検討】

(1) 国立環境研究所Ⅱ型共同研究への参画

国立環境研究所と地方環境研究所で実施しているⅡ型共同研究「災害時等の緊急調査を想定したGC/MSによる化学物質の網羅的簡易迅速測定法の開発」では、事故・災害時における初動時スクリーニングに有効なGC/MSによる全自動同定定量データベースシステム(AIQS-DB)の構築が目的である。

このAIQS-DBは、GC/MSの装置状態と測定条件を一定に揃えることにより、標準物質がなくても原因と想定される化学物質の同定と半定量が可能なシステムである。このデータベースシステムには、標準品の入手困難な物質も含み、約1000物質のデータを収載されており、このシステムで多成分分析が実施可能となれば、迅速に多くの原因物質を特定でき、緊急事故時には有用となる。

このシステムを利用するためには、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、これは評価用試料(クライテリアサンプル:以下クライテリア)の測定で装置レベルの状況確認ができる。関係研究機関では、所有するGC/MSの機種が異なるため、どの機関でも同じ結果が得られるように、同じカラム、機種毎に測定条件を設定している。(図1-1, 2)

このクライテリアには、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(図1-3)が選ばれており、個々の化合物の測定感度、テーリング度、リテンションタイム、イオン強度の変化を数値化し、装置状態の確認を行っている。当センターの機種では14物質に関してパスした。残る7物質は評価基準より低く、装置やカラム等のわずかな汚れや劣化が原因と想定され、装置のメンテナンスと共に装置条件の最適化を進めている。

なお、このシステムによる解析やデータの取り扱いの研修もⅡ型共同研究の中で実施されている。

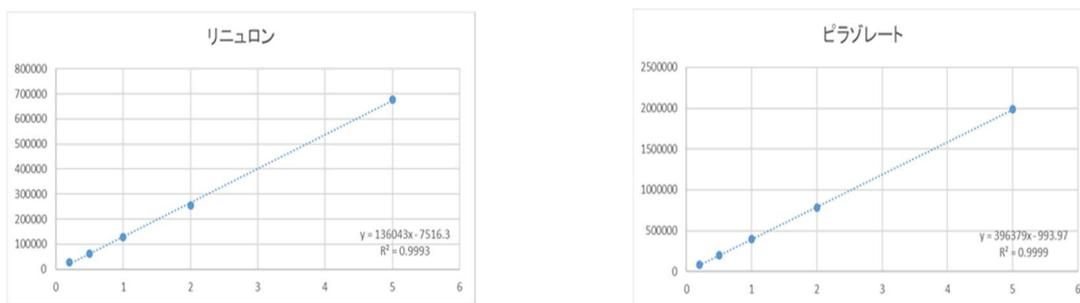


図 1-4. 分析検討を行った物質の検量線例

【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】

(1) 生物応答を用いた各種水環境調査方法の比較検討

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」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（図 2-1）を用いた急性毒性試験を実施した（図 2-2）。その結果、実施したすべての濃度区において致死は起こらなかった。他の試験機関が行った各種試験の結果と比較して矛盾のない結果が得られ、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共に、他の生物種を用いた水環境調査方法との比較を行うことができた。



図 2-1. ゼブラフィッシュ
(上:メス、下:オス)

(2) 魚種による応答差の確認

魚種による結果の差異を比較するため、以下の 5 種類の魚類を用いた急性毒性試験の実施を試みた。

- 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」と表記。）
- 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」と表記。）
- ③ 市販のゼブラフィッシュ（以下、「ゼブラ市販」と表記。）
- ④ 市販のヒメダカ（図 2-3）（以下、「ヒメダカ」と表記。）
- ⑤ 市販のグッピー（図 2-4）（以下、「グッピー」と表記。）

なお、①～③については令和 2 年度（2020 年度）に実施し、令和 3 年度（2021 年度）に④および⑤の追加試験を実施した。

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 0.03 mg/L と定められている。

急性毒性試験の結果、それぞれの過半数致死濃度（LC₅₀-96h）は以下の通り算出された。（表 2-1）

表 2-1. 魚種による亜鉛の LC₅₀-96h

魚種（ゼブラ系統）	LC ₅₀ -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 2-1 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、対照区の死亡率が暴露終了時に 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り、「ヒメダカ」、「グッピー」については明らかにじゅん化期間が不十分だったと推定された。またゼブラ市販の感度は国立環境研究所系統のゼブラフィッシュと大きな差はなかったが、国立環境研究所系統のゼブラフィッシュは当センターで飼育継代を行っており、ふ化の段階からじゅん化されていることから、じゅん化期間についてはこれらのゼブラフィッシュに比べて明らかに短かった。

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、用いる魚を試験に用いる飼育水に十分なじゅん化させておくことが重要であり、じゅん化が確認できないまま、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、用いる魚を用いる飼育水に十分じゅん化させ、そのじゅん化を確認してから試験実施することが重要と再認識した。



図 2-2 ゼブラフィッシュによる急性毒性試験の様子



図 2-3 ヒメダカによる急性毒性試験の様子

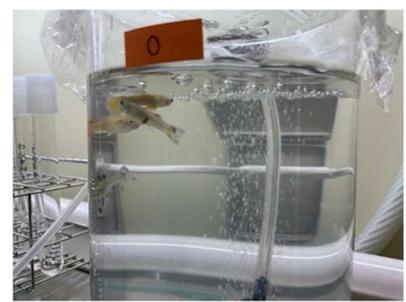


図 2-4 グッピーによる急性毒性試験の様子

3. まとめ

【サブテーマ①：機器分析による化学物質の緊急時調査手法の検討】

- II 型共同研究に参画し、共通解析ソフトを用いた解析方法を取得した。クライテリア測定した結果、GC/MS の装置を一定レベルにするためにメンテナンスや装置条件の検討が必要であることがわかった。
- LC/MS 分析対象物質の見直し・分析方法の改良を図り、分析対象追加物質の標準溶液を用いた、これまで検討した一斉測定条件での検量線作成、超純水への添加回収試験についても、概ね良好な結果が得られ、昨年度と合わせて 104 物質の分析が可能となった。
- 今後も引き続き GC/MS による化学物質の網羅的簡易迅速測定法の開発と、LC/MS 分析対象物質の追加を環境リスク評価等から優先順位付けして本研究を進めていきたい。

【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】

- II 型共同研究に参画し、統一試料を用いた、国立環境研究所系統のゼブラフィッシュによる急性毒性試験を実施したところ、他の試験機関が行った各種試験の結果と比較して相違ない結果が得られた。

- 国立環境研究所系統のゼブラフィッシュは、ふ化の段階からじゅん化がなされていることから、魚類急性毒性試験の実施には市販の魚種より国立環境研究所系統のゼブラフィッシュが望ましいことがわかった。
 - 今後も引き続きⅡ型共同研究参加機関と協力して本研究を続けていきたい。
-