

博士論文

水生生物における化学物質の濃縮性への代謝要因の影響に関する研究

平成 28 年 11 月

宮本 貢

目次

第1章	緒論	1
1.1.	環境汚染・生物濃縮性懸念物質と化学物質規制の国際動向	1
1.2.	生物濃縮性とその主な支配・影響要因と予測手法	8
1.3.	生物濃縮性への代謝要因の影響	14
1.4.	無脊椎動物の生物濃縮性評価	17
1.5.	本研究の目的	23
第2章	生物・代謝多様性を踏まえ、体内致死濃度を活用した節足動物の簡便濃縮性評価手法の検討	25
2.1.	緒言	25
第1節	殺虫剤ピリダリルのセスジユスリカ、ヨコエビの一種に対する急性毒性と代謝	26
2.2.1.	材料と方法	26
2.2.2.	結果	30
2.2.3.	考察	37
第2節	殺虫剤ピリダリルのセスジユスリカ、ヨコエビの一種のBCF推算と野外での無脊椎動物生物濃縮データとの比較	39
2.3.1.	材料と方法	39
2.3.2.	結果	42
2.3.3.	考察	44
2.4.	小括	45
第3章	一次代謝物に着目した速度論的解析や <i>in vitro</i> 試験活用の類縁体BCF簡易評価手法の検討	47
3.1.	緒言	47
3.2.	実験	48
実験1	トランス異性体テトラメトリンのブルーギルにおける濃縮、代謝、排泄挙動	48

3.2.1.1. 材料と方法	48
3.2.1.2. 結果	56
実験2 テトラメトリン幾何異性体シス、トランス体のコイホモジネートに おける <i>in vitro</i> 分解速度とシステトラメトリンの魚 BCF 値の推算	63
3.2.2.1. 材料と方法	63
3.2.2.2. 結果	65
3.3. 考察	66
3.4. 小括	68
第4章 混合物微量分析や代謝阻害剤を活用した濃縮性への代謝要因の推 定簡便法の検討	69
4.1. 緒言	69
4.2. 実験	70
実験1 <i>d</i> -フェノトリン幾何異性体のコイにおける生物濃縮性	70
4.2.1.1. 材料と方法	70
4.2.1.2. 結果	73
実験2 酸化酵素阻害剤ピペロニルブトキサイドによる <i>d</i> -フェノトリン幾 何異性体の BCF 変化	75
4.2.2.1. 材料と方法	75
4.2.2.2. 結果	76
4.3. 考察	78
4.4. 小括	80
第5章 総合考察	81
5.1. 代謝要因有無での BCF 差異比較	81
5.2. 代謝要因を考慮した生物濃縮性精緻評価のための簡便手法の蓄積	82
5.3. 今後の展望	87
5.4. 結論	90
要約	91
謝辞	95
引用文献	96

第1章 緒論

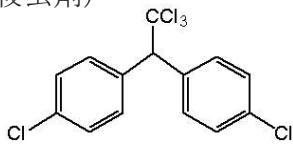
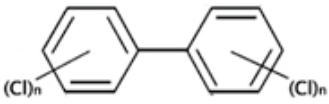
1.1. 環境汚染・生物濃縮性懸念物質と化学物質規制の国際動向

現在の社会・人々の生活においては、色々な機能・特徴を有する様々な人工合成化学物質はもはや無くてはならないものとなっており、人類はそれら人為的物質に依存し、恩恵を受けて繁栄していると言える。人工合成化学物質にはそれぞれに機能的特徴があり有用である一方で、それら個々の化学物質には様々な潜在的危険性があり得る。従って、危険性と便益性（あるいはリスクとベネフィットと言うフレーズが良く用いられる）のバランスを充分考慮して使用し、場合によっては使用制限、使用禁止とすることが重要である。例えば、難病の特効薬のその高活性に関連した副作用などが挙げられ、製造者の精緻な製品・情報の提供と管理、利用者の十分な便益性と危険性の理解の元での判断・活用・使用法遵守が肝要と言える。かつて睡眠薬として奇形の薬害を引き起こし使用禁止となったサリドマイドが、近年になって特殊な治療薬として限定的に認められたのはその一例と言える（厚生労働省，2008）。

特に、大量に広範囲で長期間用いられる様な化学物質による環境汚染においては、被害地域の広範さ、回復に要する期間の長さなど規模が想像を絶する可能性がある。これは自然環境の複雑性、許容性や応答の予測困難さに関連し、その危険性を過去の経験や当時の科学知見・技術からは十分に掌握できなかったことが第一の原因であるものの、加えて危険性の直接の被害者が使用者や便益性の享受者と一致しないこと等もあり、兆しに気付かず配慮不十分となり、結果的に甚大な環境汚染として問題となるのが典型と思われる。過去の環境汚染事例のうちでも、表1に示す生物濃縮性に関連した Polychlorinated Biphenyl (PCB) や Dichloro Diphenyl Trichloroethane (DDT) などの広域、世界的な汚染や食物連鎖を介しての生態系のかく乱や個体群の減少・絶滅などは重大な教訓となり（湯嶋ほか，1973；Colborn *et al.*，1996）、生物濃縮性は化学物質の安全性評価の最重要項目の1つとなっている。20世紀までの第二次世界大戦後のいわゆる東西冷戦時期と前後した急速な高度経済成長や経済グローバル化においては例示したような化学物質の卓越した機能の活用による便益性や開発、発展を優先し、体制・システム整備も含めて危険性の事前検証や抑止が不十分となり幾度となく化学物質に関する大きな事故を引き起こした例が多い。しかしながら、21世紀は持続的・安定な地球環境との共生に向けて、欧州連合（EU）を筆頭に不確実性も考慮

した予防原則と環境保護を重視する時代となっており、世界各地においても化学物質のヒトのみならず環境に対する危険性を優先して是非判断すべく事前の様々な安全性関連項目の調査が求められている。

表 1. 環境汚染、生物濃縮性に関連した過去の代表的問題事例

化合物（代表的用途・発生源）	問題事例*
DDT（殺虫剤） 	1940-50 年代、米国の湖でボウフラ防除に処理した DDT が魚(10 ppm)を經由し鳥(脂肪中 1,600 ppm)に濃縮し大量死、個体数減少。
メチル水銀化合物 （工場排水混入廃棄物） $\text{CH}_3\text{-Hg-X}$	1950-1960 年代、熊本県水俣市や新潟県阿賀野川周辺で工場排水中のメチル水銀が魚に濃縮し摂取した人々が中枢神経麻痺を発病。
PCB（絶縁材料） 	1960 年代以降、河川のみならず外洋の魚にも PCB が認められ、1970 年代には人体脂肪（～13.3 ppm）、母乳（～0.26 ppm）に検出。
トリブチルスズ化合物 （船底・漁網防汚剤塗料） $(n\text{-C}_4\text{H}_9)_3\text{-Sn-X}$	1960 年代以降各地で使用され、魚介類汚染、カキ養殖被害、巻貝雄化影響判明。以後多国で使用規制も残留・蓄積性に関連し巻貝の雄化、個体数減少残存。

*: 湯嶋ほか, 1973 ; 山県, 1978; WHO, 1990a; 里見ほか, 1992

化学物質の生物濃縮性の指標としては「生物濃縮係数」（あるいは「生物濃縮倍率」）が広く用いられている。概念的には、生物の生息している媒体である水、底質、土壌、あるいは餌などの周辺環境・状況における化学物質濃度に対する対象生物中の濃度の倍率である。暴露経路や評価状況の違いなどからこれまでに様々な生物濃縮性およびその指標の生物濃縮係数が取り扱われている（松尾ほか, 1980; Miyamoto *et al.*, 1990; 畠山, 2006; 仲井ほか, 2006 ; Katagi, 2010; OECD, 2012 ; ECETOC, 2014）。生態学的な複雑な解釈を要する食物連鎖を介しての栄養段階間における生物濃縮性を示す係数（Trophic Magnification Factor, TMF）は別として、代表的な生物濃縮性指

標としては以下の4つが挙げられる。

①Bioaccumulation Factor (BAF) :

周辺環境全般（水、土壌、餌）からの生物濃縮係数

②Biomagnification Factor (BMF) :

餌からの経口摂取による生物濃縮係数

③Bioconcentration Factor (BCF) :

生息媒体（主に水）からの呼吸・経皮での生物濃縮係数

④Biota-Substrate(Soil/Sediment) Accumulation Factor (BSAF) :

生息基質の土壌や底質からの生物濃縮係数

また、関連して、生物濃縮性評価の国際的な実験室内標準試験法として知られる主なものは表2に挙げたとおり、経済協力開発機構（OECD）、EU、米国の環境保護庁（US EPA）や試験材料協会（ASTM）、日本では農薬登録申請、化学物質の評価用 JIS や化審法登録申請用のものなどがある。評価対象は、水生生物、底生生物、土壌生物と主な生息環境は考慮されているものの、生物の分類は魚類（脊椎動物）、腹足類（軟体動物）、貧毛類（環形動物）であり環境生物の多様性を考えると限られたものと言える。

これらのうちで最も広く用いられている評価生物は水生生物の魚類である。また、近年、主に難水溶性化合物においては実験における水中濃度の安定維持や定量分析の困難さに関連した評価の難しさや、実際の環境中における現実的な生物の取込み経路の観点なども踏まえて、餌からの暴露による BMF の評価が OECD 試験ガイドラインにも組み込まれて着目されて来ている。しかしながら、濃縮メカニズムや要因解釈、関連パラメータの標準化・応用、データベースの活用性などから、暴露水中の濃度と生物中の濃度の比として下式で示される BCF が最も広く用いられている。

$$\text{BCF} = \frac{\text{生物中の化学物質濃度}}{\text{水中の化学物質濃度}}$$

表 2. 国際的な生物濃縮性試験法ガイドラインと推奨供試生物種、主暴露経路と評価指標

生物（推奨種）	主暴露経路／評価指標	ガイドライン
魚類 (コイ、メダカ、ブルーギル、ニジマス等)	水暴露／BCF	OECD : 305 ¹⁾ EU : EEC C13 ²⁾ 米国 : US EPA OPPTS Draft850.1730 ³⁾ , ASTM E1022 ⁴⁾ 日本 : 農林水産省 2-9-17 ⁵⁾ , 化審法 試験法 ⁶⁾ , JIS Z7260-305 ⁷⁾
	餌暴露／BMF	OECD : 305 ¹⁾ 日本 : 化審法試験法 ⁶⁾
貝類 (バージニアガキ等)	水暴露／BCF	米国 : US EPA OPPTS Draft850.1710 ⁸⁾ , ASTM E1022 ⁴⁾
ミミズ (シマミミズ等)	土壌暴露／BAF、BSAF	OECD : 317 ⁹⁾
底生ミミズ (イトミミズ等)	底質暴露／BAF、BSAF	OECD : 315 ¹⁰⁾ 米国 : US EPA EPA600/R-99/064 ¹¹⁾ , ASTM E1688 ¹²⁾

1) OECD, 2012; 2) EC, 1998; 3) US EPA, 1996; 4) ASTM, 1994; 5) 農林水産省, 2014;
6) 厚生労働省ほか, 2015; 7) 通商産業省, 2000; 8) US EPA, 1996a; 9) OECD, 2010;
10) OECD, 2008; 11) US EPA, 2000; 12) ASTM, 1997

現状では歴史的な環境汚染指標、実験データ蓄積状況、ガイドライン状況とその試験法における暴露経路の一般性などからも世界的な第一の評価指標は魚における BCF と
言える。その魚 BCF 試験の最も代表的な試験法である OECD ガイドラインの最新の標準
的な試験デザイン概要を以下に例示する。

- ・試験系 : 連続流水系 (5 回以上換水／日)
但し、低水溶解度の水暴露困難物質では経口投与評価法あり

- ・試験区数： 3 試験区 (2 暴露区+1 助剤対照区)
但し、濃縮性懸念度合から 1 暴露濃度・低分析頻度手法あり
- ・供試魚数： 48-80 個体／試験区
- ・試験濃度： 長期無毒性 (或いは急性毒性 $\leq 1\%$) 濃度およびその 1/10 濃度
- ・試験期間： 暴露期間：通常 28 日、場合によって延長し最大 56 日
排泄期間：最大 60 日 (或いは $\geq 95\%$ 消失)
- ・化学分析： 水：定期的 (概ね毎週、各点 $n\geq 1$) に分析
魚／曝露期間： ≥ 5 点 (3 点で濃縮平衡確認、各点 $n\geq 1$)
排泄期間： ≥ 4 点 (消失半減期・速度定数確認、各点 $n\geq 1$)

上記の標準試験方法も簡単に作成されたものではなく、魚濃縮性試験の OECD ガイドライン改訂の歴史も長い。初期の 1981 年の版においては日本、米国、欧州といった様々な国からの提案を踏まえて、以下のような試験システム・供試魚・評価パターンの異なる 5 種類の試験手法が 1 つのガイドライン中に併記されたものとして採択された (OECD, 1981)。

- A：段階的止水系 (アメリカナマズ等供試／1 週間程度の暴露・排泄期設定)
- B：半止水系 (ゼブラフィッシュ供試／4 週間の暴露期設定)
- C：日本通産省化審法手法 - 流水系 (コイ供試／8 週間の暴露期設定)
- D：止水系 (グッピー等供試／8 日以内の暴露期設定)
- E：加速法流水系 (各種淡・海水魚供試／4 週以内暴露・60 日以内排泄期設定)

その後 1996 年のガイドライン改定により標準試験法として統一化が図られ、正確な濃度維持のための流水条件下の試験系、水中濃度と魚体中濃度実測からの BCF 解析に加えて魚体中濃度推移から評価した取込み・排泄速度定数からの速度論的な BCF 解析手順、更に推奨魚として汎用の淡水魚ではゼブラフィッシュ *Danio rerio* Hamilton、フアットヘッドミノー *Pimephales promelas* Rafinesque、コイ *Cyprinus carpio* Linnaeus、ミナミメダカ *Oryzias latipes* Temminck & Schlegel、グッピー *Poecilia reticulata* Peters、ブルーギル *Lepomis macrochirus* Rafinesque、ニジマス *Oncorhynchus mykiss* Walbaum、イトヨ *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus が規定された (OECD, 1996)。そし

て、生物濃縮性評価の重要性を踏まえた更なる精緻化・標準化や化合物の多様性・高難度物質評価の必要性や動物愛護等にも配慮し 2012 年に更なる改訂として、経口投与評価手法や簡易水暴露法が併記され現在のガイドラインが作成された (OECD, 2012)。

また、この最新ガイドラインでは生物濃縮性の特徴と結果や関連パラメータ、評価の標準化などの観点から供試魚の脂肪含有率を踏まえて脂肪含有率 5%換算や試験期間中の魚の成長による体重増加での希釈を補正した BCF 値などの計算も示され、生物試験に由来する変動を最小化した緻密な実験が求められている。従って、試験実施には長期間、高度技術、高額費用を要する。すなわち、試験期間としては 2-4 ケ月程度、各種予備検討を含めれば半年以上を要し、供試生物に長期間影響がない低濃度で評価する必要があるため、水中暴露濃度を安定に維持する送液ポンプや大型水槽、排水系などを有する試験装置や、水および魚の微量分析技術が必要となる。更に、試験期間中、生物や試験装置の維持管理、定期的な水、魚サンプル分析を要し、これらの操作煩雑性や高度技術の要求などから、条件（化合物、試験機関等）により変動はあるものの試験価格は高額となり、125,000 ドル（およそ 1,300 万円）などの例もある (Weisbrod *et al.*, 2007)。なお、魚分析における分析部位に関しては、過去の米国の農薬用試験法 (US EPA, 1982) ではヒト食糧の評価の観点などから、可食部と非食部の部位別の分析が求められていたが、現在では生態学的な食物連鎖における捕食・被食の観点などから、通常は魚全身の分析となっている（日本の化審法試験法において濃縮性が比較的高い場合には特異的な濃縮部位の有無に関する追加情報の収集のために各種部位別分析が求められている）。また、各分析時の魚サンプル数については、実務性や継時的な濃度推移解析に重点が置かれ、一部（日本の化審法試験）を除いて通常は 1 連で許容されている。

世界中の多くの地域における農薬や防疫薬、一般化学物質など様々な化学物質の安全性評価の基本的な考え方は、過去には“有害性・毒性”のみで評価するハザード評価が主流であった。しかしながら、現在ではリスク評価に移行しており“有害性・毒性”と“暴露濃度・暴露可能性”との比較評価となっている。また暴露と毒性を比較するリスク評価においては安全係数 (Margin Of Safety、MOS) も考慮されている (畠山, 2006 ; 宮本ほか, 2008)。しかしながら、幾つかの重要項目については国や地域による違いはあるものの使用法に関連した“暴露濃度・可能性”の程度に関係なく、化合物の特性からの“有害性・毒性”レベルのみでのハザード評価で登録不可となる項

目も新たに設定されている。生物濃縮係数 BCF はその典型的なものと言える。それ自体は化学物質の有害性に関連する特徴指標ではあるものの環境挙動や暴露濃度を予測するための指標であり、直接リスク評価に用いる指標ではないものの、環境中での残留性や環境生物への毒性あるいは地球規模での長距離移動性などと掛け合わせ化学物質規制に活用されている。これは、環境保全・汚染防止の近年の更なる高まりや、複雑な実環境での予測の不確実性・困難さ、上記の過去の大きな問題事例なども踏まえた高懸念化学物質に対する予防原則の考え方による。評価や規制に関連する BCF 値の基準に関する代表的な例を表 3 に示す。

表 3. 世界各地域の化学物質規制における生物濃縮性基準の代表例

適用範囲	規制概要	BCF 基準
国際条約	ストックホルム POPs ¹⁾ 条約：廃絶、制限等 (UN, 2001)	>5,000
欧州登録 (EU; 2006, 2009, 2014)	一般化学品：高懸念物質・詳細評価 PBT ²⁾ 基準	>2,000
	殺生物剤、農薬：代替剤候補・登録不可 PBT ²⁾ 基準	
	一般化学品：高懸念物質・詳細評価 vPvB ³⁾ 基準	>5,000
殺生物剤、農薬：登録不可 vPvB ³⁾ 基準		
	農薬：登録不可 POP ¹⁾ 基準	>5,000
日本登録	一般化学品 (厚労省ほか, 2011)：優先評価・監視化学物質基準	>5,000
	農薬 (環境省, 2008)：許容 1 日摂取量評価への魚考慮基準	>5,000
米国登録	一般化学品 (TSCA ⁴⁾ ; US EPA; 1999, 2010a)：上市制約 PBT 基準	>5,000
	排出情報、追加データ等要求 PBT 基準	>1,000

- 1) 残留性有機汚染物質 (Persistent Organic Pollutants)
- 2) 残留性・濃縮性・毒性物質 (Persistent, Bioaccumulative and Toxic substance)
- 3) 高残留性・高濃縮性物質 (very Persistent and very Bioaccumulative substance)
- 4) 有害物質規制法 (Toxic Substance Control Act)

先に挙げた過去の生物濃縮性に関連した問題事例化合物の標準的指標生物群である

魚類における BCF 値としてはそれぞれ以下のような極めて高い値などがこれまでも報告されており (WHO; 1989, 1992, 1989a; 中西ほか, 2006; 里見ほか, 1992)、上記の BCF 基準と比べればこれらの環境汚染物質の懸念の高さがうかがえる。

PCB :	270,000 倍 (ファットヘッドミノー)
DDT :	154,100 倍 (ファットヘッドミノー)
塩化メチル水銀化合物 :	8,033 倍 (ニジマス)
ビス酸化トリブチルスズ :	11,000 倍 (マダイ、アゴハゼ)

世界各地域の化学物質規制の中でも、欧州での化学物質の登録・再評価においては、その細部への適用も厳しく、一般化学品では 0.1%以上の不純物にも、また、殺生物剤や農薬においては主要な環境分解物にも生物濃縮性の評価が求められている。日本においても、一般化学物質規制である化審法においては微生物を用いた分解度試験における分解生成物がその後の生物濃縮性の評価対象となる。これらのことから、生物濃縮性は化学物質の登録可否、すなわち社会での実用性に大きく関わる重要な項目であり、かつ、微量混在物や環境分解物など様々な関連化合物も含めた多岐に渡る評価が益々必要とされて来ている。従って、上述のように標準的ガイドライン試験が長期間を要して煩雑・高額であることや、動物愛護の観点も相まって、生物濃縮性の精緻な予測手法や簡便評価手法の蓄積、整備、有効活用が求められている。

1.2. 生物濃縮性とその主な支配・影響要因と予測手法

水生生物の生物濃縮性に関連する速度論、熱力学、生物物理学的なメカニズムや支配・影響要因、予測手法とその制限因子などについて、これまでに数多くの研究成果を踏まえて、総説・解説がなされている (松尾ほか, 1980; Connell, 1988; Huckle *et al.*, 1990; Barron, 1990; 西原ほか, 1993; Spacie *et al.*, 1995, 若林, 2000; Arnot *et al.*, 2006; 仲井ほか, 2006; 畠山, 2006; Katagi, 2010)。生物濃縮性の主な支配・影響要因を概観すると、図 1 に示すように、該当する化合物の要因や対象となる生物の要因に加えて環境条件の要因もあり、それらが相互に関わっていると言える。すなわち、生物濃縮性のプロセスである生物への当該化学物質の取込み、分布、代謝、排泄の過程における膜透過、細胞・器官間/内の輸送・蓄積や代謝分解等の酵素作用に

は、化合物自体のみならず対象となる生物個々の関連した特徴や、それらに関連し得る環境要因が様々に影響し合うことになる。

化学物質の分子サイズは生物膜の透過性などに関与し、また水溶性／脂溶性は生物内での親和性・脂肪蓄積性に大きく関与し、官能基や部分構造は分解性に大きく影響を及ぼし得る。一方、対象生物の条件では、濃縮性に大きくかかわる体脂肪含量や組成などにも関わる要因として生物種の違いはもちろんのこと、体サイズ、性差、成長段階や呼吸・栄養状態なども影響する (Kara *et al.*, 1989; Schlts *et al.*, 1994, 1999; Bradbury *et al.*, 1993)。脂肪の量や質による影響の一例を挙げると、Geyer *et al.* (1997)は Lindane において様々な生物種の幅広い BCF 値 43~4240 がそれら生物の脂肪含有量 2.3~37.8%と正の相関となることを明らかにし、Ewald *et al.* (1994)は様々な魚の脂肪を用いて Tetrachlorophenyl の水との分配係数を評価し脂肪中にリン脂質の少ないタイセイヨウサケ、ウナギ、ニシンなどリン脂質の多いタラなどよりも高値を確認している。更に、周辺環境条件では、水中と生物間での化学物質の親和性・利用性や生物における代謝等にも関連しうる温度や硬度、pH などの水質のみならず暴露濃度や共存物質などの違いも生物濃縮性の変化に影響を及ぼし得る。

本論文で取り扱う「代謝」は、一般的に用いられている生物内でのエネルギー／栄養の利用・循環・生体生理機能の一環ではあるものの、外因性物質の代謝分解であり、分解・解毒・排出のための生理応答と言える。すなわち、代謝反応の主要な器官としては肝臓であるが鰓、消化管なども寄与し、細胞内のミクロソーム画分 (約 10000xg の遠心分離後の沈殿画分) や上清あるいはミトコンドリア、血清などに遍在する様々な酵素系により、第 1 相反応の各種の酸化、還元、加水分解などに加えて第 2 相の抱合化反応としてグルクロン酸、硫酸やアミノ酸抱合化などが知られており、これらにより解毒、親水 (水溶性) 化による易排泄性が付与される (加藤ほか, 2000)。水生生物の代謝様式に関しては環境汚染の指標、産業との関わりなどもあり、魚を中心に 1980 年代から幅広く知見が集積されている (Lech *et al.*, 1985; Huckle *et al.*, 1990; Di Giulio *et al.*, 1995; Schlenk *et al.*, 2008; Katagi, 2010; Tierney *et al.*, 2014)。

なお、金属等の無機化合物については、第二次世界大戦後の核実験に関連した放射性物質汚染研究や、重金属汚染に関連して別途様々な調査・研究・解明がなされ (山県, 1978; DeForest *et al.*, 2007; Fatima *et al.*, 2014; いであ株式会社, 2015)、有機化学物質よりも特異的な組織結合性・親和性、体内必須元素 (カルシウム、亜鉛

など) との性質類似性に関連した挙動や濃度依存性、更には直接の毒性懸念などがフォーカスされており、一般的な有機化学物質の生物濃縮性とは各種異なる点もあることから、本論文では無機化合物については割愛する。

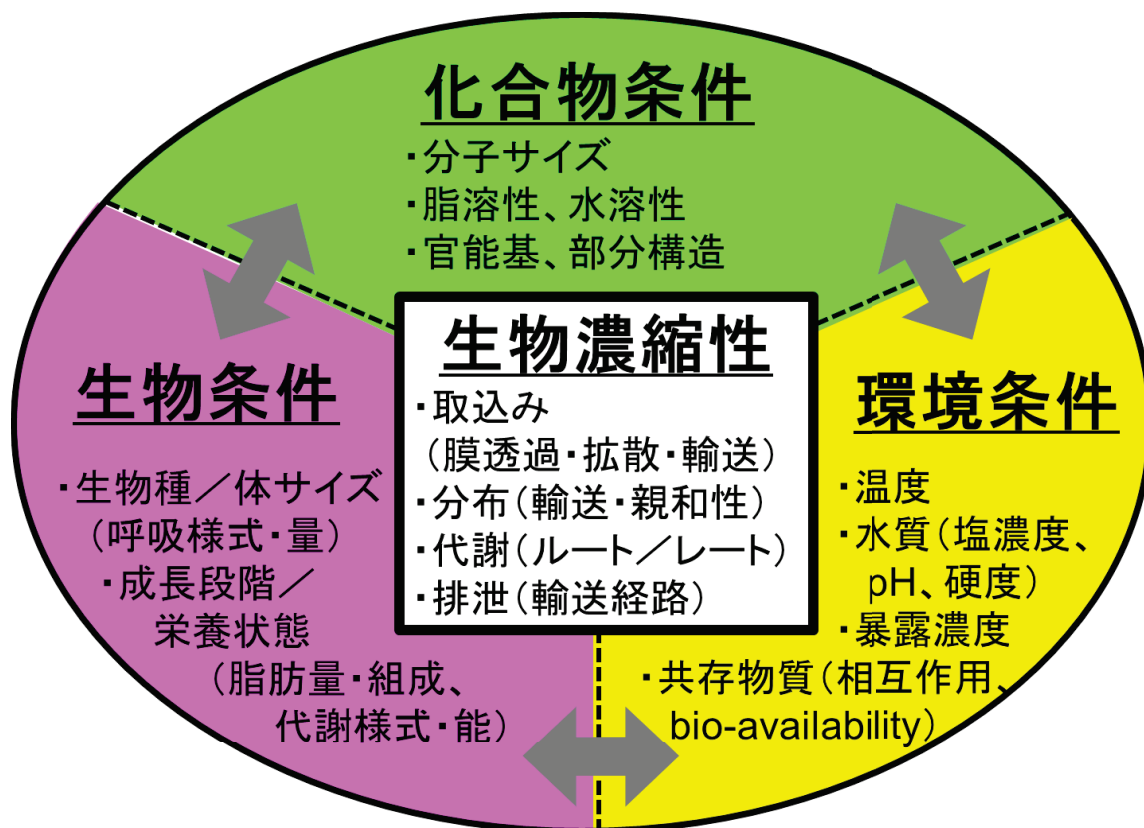


図1. 生物濃縮性の様々な支配・影響要因

上述の有機化学物質の生物濃縮性における支配要因のうち最も大きなものは化合物の脂溶性であり、代表的な予測のための物理化学的指標としては脂溶性に関するオクタノール/水分配係数 (Kow) が知られている。様々な化学物質の既存データを用いた Kow と魚 BCF の関係例を図2に示す。これは欧州化学工業連盟 (European Chemical Industry Council, CEFIC) の長期研究支援事業 (Long-Range Research Initiative, LRI) の一環でまとめられた信頼性の高い魚 BCF データベース (CEFIC, 2014) と US EPA の各種推算プログラム EPI Suite (US EPA, 2012) 中に収載されている Kow データから

作成したものであるが、Meylan や Arnot らが提唱し EPI Suite での魚 BCF の推算においても考慮されている非イオン性化学物質の予測（後述）と傾向が良く一致する。

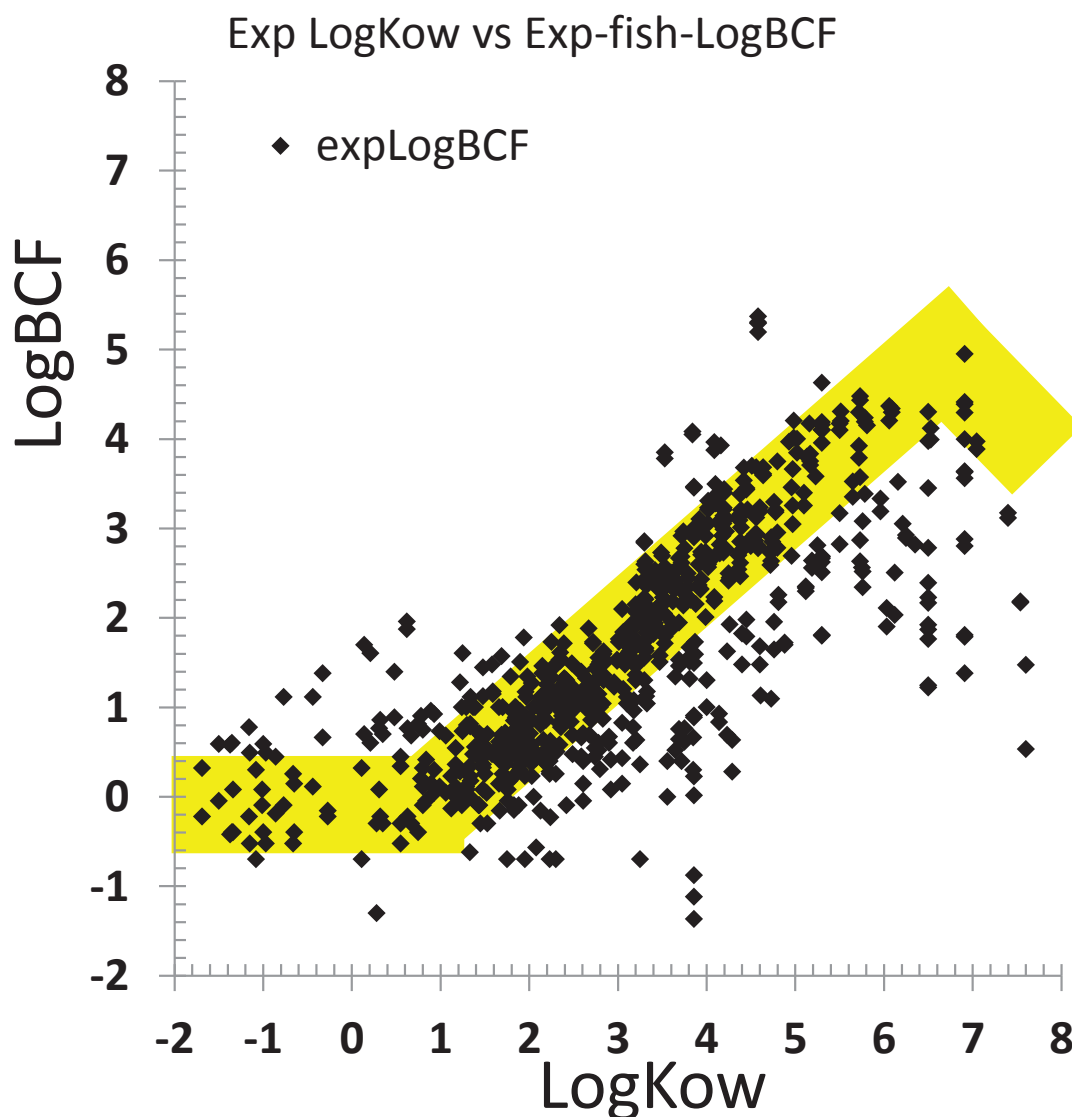


図 2. オクタノール／水分配係数(Kow)と魚濃縮性(BCF)の関係の一例

CEFIC(2014)の LRI toolbox に高信頼性データベースとして収載されている BCF 値(特殊重金属等を除く)と、対応する化合物のうち US EPA(2012)の EPI Suite プログラムに収載された Kow の実測データ(複数では平均値)のあるものからグラフを作成(n=780)。

すなわち、Kow およそ 1 から 7 程度においてはその脂溶性増大と比例的に BCF は増大し、Kow がそれを超える超疎水性の領域においては Kow と反比例的に BCF は低下傾向となる。この超疎水性領域における低下は、親水相・疎水相部を有する脂質 2 重膜で構成される生体膜の透過性によると言われている (Arnot, 2006)。この図 2 においても、上記の疎水性の規則性から逸脱した化合物データも多く見られ、その他の図 1 に挙げた様々な影響要因が複雑に関連していることがうかがえる。

また、生物の外部からの化合物の取込み経路としては経口、経皮、呼吸があるが、そのうちでも間断なくガス交換を行う必要のある呼吸が最も重要な経路と言われ、魚における経皮経路は、呼吸を含めた全体の 2-4% (ニジマス)、7-9% (ナマズ) などの報告もありマイナーとされている (Kleinow *et al.*, 2008)。いずれの取込み経路にしても微視的に体内への移動プロセスを見た場合、細胞の脂質 2 重膜を透過する必要がある。膜透過には単純拡散、流れ・仲介・能動キャリア輸送など様々な機構とそれに伴う制約があり (松尾ほか, 1980)、上記の通り物質の親水性・疎水性・超疎水性による生体膜の透過性が異なることに加えて、物質分子の大きさや立体的なかさ高さに膜透過の閾値があるとされている (斉藤, 1992; 仲井ほか, 2006)。すなわち、脂質 2 重相の生体膜の恒常的な自由度に比べて巨大すぎる分子サイズの物質においては膜透過に制約があり生物濃縮しないと言える。

上記の生物濃縮性支配要因における主要な化合物要因である分子サイズや脂溶性、代謝能にも関連した部分構造を考慮した BCF の予測手法について、これまでに色々な研究がなされている。冒頭に挙げたように生物濃縮性は化学物質の安全性評価において最重要項目の 1 つであることから、各種学術的な研究成果を踏まえて、各地域の化学物質規制当局も評価過程への予測手法の組み込みを検討している。一般的な BCF 予測手法の幾つかを以下の表 4 に示す。主に、化合物の脂溶性・疎水性、分子サイズ、あるいは部分構造の 3 点を考慮したものが挙げられる。

脂溶性・疎水性に着目した予測においては直結するパラメータである分配係数や水溶解度を用いたものが挙げられ、代表的なものとしては分配係数対数値と BCF 対数値が正比例で示される Veith *et al.* (1979) の回帰・推算式が良く知られているが、他にも超疎水性化合物での BCF の低下も踏まえた分配係数の 2 次関数式など色々なものが提唱されている。

表 4. 魚 BCF 予測・回帰式の代表例

主要因			予測（回帰）式代表例	提唱者例
A	B	C		
*			$\text{LogBCF} = a \times \text{LogKow} + b \times \text{Log}(c \times \text{LogKow} + 1) + d$ Kow: オクタノール/水分配係数 ; a, b, c, d: 係数= 0.910, -1.975, 6.8×10^{-7} , -0.786 (化学物質, n=154)	Bintein <i>et al.</i> (1993), OECD(2012), ECHA (2014)
*			$\text{LogBCF} = a \times \text{LogKow} + b$ a, b=0.85, 0.70 (化学物質, n=59); 0.4337, 0.5201 (農薬, n=86); 1.05, -1.71 (化学品, n=54)	Veith <i>et al.</i> (1979), Katagi (2010), NITE (2009a)
*			$\text{LogBCF} = a \times \text{LogKow}^2 + b \times \text{LogKow} + c$ a, b, c=-0.2, 2.74, -4.72 (化学物質, n=43)	Connel (1988), ECHA (2014, 2015)
*			$\text{LogBCF} = a \times \text{LogS} + b$ S: 水溶解度, a, b=-0.47, 2.02 (化学物質, n=107)	Isnard <i>et al.</i> (1988), ECHA (2014)
	*		$\text{BCF} < A, \text{ if Molecular Weight (MW) or Volume (MV) } \geq B$ A, B: 閾値=100, 700 (MW) ; 約 10^3 , 400-500cm ³ /mol (MV)	Dimitrov <i>et al.</i> (2003), 斉藤(1992)
	*		$\text{BCF} \leq A \text{ if } D_{\text{max}}(\text{直方体最大辺}) \text{ or } D_{\text{eff}}(\text{円柱最小径}) \geq B$ A, B=1000, 2.0nm (Dmax) ; 1000-5000, 0.95-1.7nm (Deff)	Sakuratani <i>et al.</i> (2008), ECHA (2014a)
*	*		$\text{LogBCF} = a \times \text{LogKow}^2 + b \times \text{LogKow} + c \times \text{MV}$ a, b, c=-0.197, 3.036, -0.808 (化学物質, n=28)	Garg <i>et al.</i> (2014), ECETOC (2014)
*		*	$\text{LogBCF} = a \times \text{LogKow} + \sum F$ a, b=0.6598, 0.333 (LogKow<1) ; 0.77, 0.70 (LogKow=1-7) ; -0.49, 7.554 (LogKow>7) ; F: 構造別補正係数(約-1.4~0.66)	Meylan <i>et al.</i> (1999), US EPA (2012)
*		*	$\text{LogBCF} = a \times \sum i + b \times \sum o$ a, b=-4.58x10 ⁻³ , 9.91x10 ⁻³ (化学物質, n=107) ; i, o: 部分構造、官能基毎の有機性無機性パラメータ	Saito <i>et al.</i> (1991, 1992)
*	*	*	$\text{LogBCF} = \text{Log}[F_m \times \{Kow^b / (a \times Kow + 1)^{2b}\} + F_w] + \sum F_i$ a, b=4.24x10 ⁻⁷ , 0.774 (化学物質, n=511) ; Fw: 生物湿重量=6.22; Fm: 代謝可能性, Fi: 分子サイズ要因	Dimitrov <i>et al.</i> (2005)

A: 脂溶性・疎水性、B: 分子サイズ、C: 部分構造

分子サイズに関しては、生体膜透過性の観点から主に閾値の推算に留まるものの、分子量、沸点分子容、直方体最大辺長、円柱最小径などがパラメータ（記述子）として挙げられている。更に部分構造を考慮したものとしては脂溶性や生体脂質との親和性にも関連しうる部分構造からの有機性、無機性に着目したものや、部分構造から様々な化合物群分類や部分構造を踏まえた経験的な実測値から導き出された補正係数を付与し代謝分解等の要因を加味したものなどが挙げられる。

これらの他にも独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) では、生物濃縮性に関する特性と既存データを踏まえた化合物群毎の生物濃縮性予測が示されている (NITE, 2009)。すなわち、膜輸送の能動的取込み性質を有する化合物群や、一般的な受動拡散による取込みが主要因となる化合物群においても構造から双極子-双極子相互作用性、水素結合性相互作用性、イオン性相互作用性などやタンパク質結合性、代謝分解性など反応性によるカテゴリ分けし、それぞれに予測式や類似物質との相互比較による定性的な予測などが既存データからの回帰等から示されている。

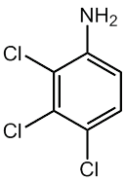
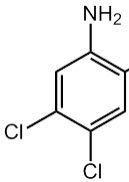
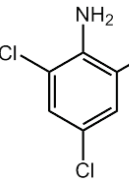
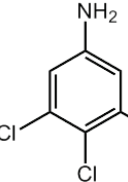
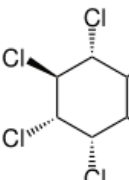
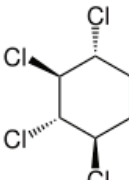
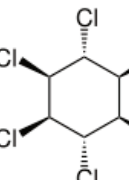
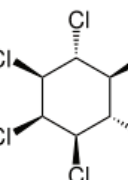
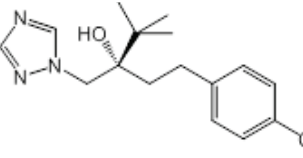
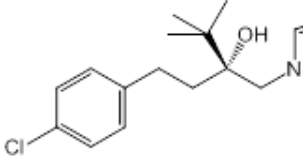
その中の代謝要因に関しては、エステル、アミド、カーバメート、ウレア結合を持つ化合物の代謝による BCF 低下、官能基における置換基効果（電子的効果、立体効果）による酵素反応性の変化可能性などがまとめられている。しかしながら、現状では酵素反応における酵素の立体構造、酵素反応における置換基の電子的効果及び立体効果、酵素反応に関与する化学物質及び水分子の数などの不明確な要因が多く、化学物質の代謝を定量に表現するパラメータ設定は困難とされている (NITE, 2012)。このような状況から、該当する化合物群での生物濃縮性の予測への代謝要因の組み込みは、類似性や経験的な考慮など限定的、定性的なものに留まっている。

1.3. 生物濃縮性への代謝要因の影響

上記のように生物への取込みと排泄の過程に関わる分子サイズや脂溶性などに加えて、生物濃縮性の重要な支配要因の 1 つとして体内での代謝分解も挙げられている。図 1 に示したとおり、取込まれた化学物質の生物濃縮プロセスには分布、代謝があり、生物体内において酵素等により代謝分解を受け難い化学物質あるいは肝臓等の代謝分解能の高い器官への移行効率の低い化学物質では生物濃縮性が高くなることになる。分子サイズや脂溶性の同様である異性体や類縁体において、生物の代謝差と BCF の違

いを研究した事例は、Jonsson *et al.* (2004) のナフタレン、フェナントレン類縁体における代謝物量確認分析も含めたシープスヘッドミノアの濃縮性評価を始め、表 5 に示すトリクロロアニリンやテブコナゾール、ヘキサクロロシクロヘキサンなどが知られている。トリクロロアニリンでは、塩素の置換位置の違いによる異性体間での脂溶性指標の K_{ow} 値の違いは殆どないものの、グッピーにおける BCF 値は、2, 3, 4 置換体 < 2, 4, 5 置換体 < 3, 4, 5 置換体 < 2, 4, 6 置換体の順で異なり、その BCF の異性体間の違いは最大で 3.3 倍となるとの報告がある (de Wolf *et al.*, 1992)。また、ヘキサクロロシクロヘキサンにおいては、光学異性体間における殺虫活性や環境中での残留性の違いも知られているが (山県, 1978)、魚の BCF 値に関しても異性体差が認められている。すなわち、グッピーにおいては β 異性体が他の 3 異性体に比べて約 1.5 倍高値の事例 (Yamato *et al.*, 1983) や、ゼブラフィッシュでは殺虫活性の高い γ 異性体が他の異性体に比べ 0.5~0.8 倍低値の事例 (Butte *et al.*, 1991) が報告されている。更に、殺菌剤テブコナゾールでは鏡像体である R 、 S 異性体間でゼブラフィッシュにおいて 1.1-1.5 倍の違いが報告されている (Liu *et al.*, 2016)。このように、異性体間における代謝分解の受けやすさによる違いが認められるとともに、そのパターンが魚種間においても異なり得ることも示唆されている。現状において、総合的に代謝要因が最も考慮されている予測の 1 つとしては、表 4 にも挙げた部分構造からの補正係数の項が組み込まれた EPA の EPI Suite が挙げられる。しかしながら、この EPI Suite においても代謝要因を考慮した補正係数は過去のデータを踏まえた経験則に基づくもののコンビネーションであり多種多様な化合物での精度には制約がある。また、プログラムへの化合物の入力は SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) が用いられ、簡便に化学構造情報が反映できる。SMILES 自体は幾何異性体や光学異性体の構造特性情報の入力が可能であるものの、EPI Suite においてはそのトレーニングセットデータ自体の限界もあり反映されていないのが現状である。表 5 に示した BCF の異性体での違いの一例、ヘキサクロロシクロヘキサンはで予測値は異性体別には評価できず、予測値も 250 であり異性体間の実測値レンジ (648-1770) と比べると良好な推算値とは言えないと判断される。テブコナゾールにおいても EPI Suite による予測値 (128.3) と実測値レンジ (9.79-16.25) の乖離は大きい。また、構造異性体の例であるトリクロロアニリンでは EPI Suite で各異性体の予測値は 72-98 であり、グッピーでの実測値 (407-1350) とはオーダーを超えて大きく異なっている。

表 5. 代謝分解性に関連する異性体間での魚 BCF の違いの例

トリクロロアニリン (de Wolf <i>et al.</i> , 1992)				
構造	2, 3, 4 置換体 	2, 4, 5 置換体 	2, 4, 6 置換体 	3, 4, 5 置換体 
(LogKow)	(3.68)	(3.69)	(3.69)	(3.61)
BCF 値 グッピー	407	759	1350	1100
[EPI Suite 推算値]	[73]	[88]	[98]	[72]
ヘキサクロロシクロヘキサン (Yamato <i>et al.</i> , 1983; Butte <i>et al.</i> , 1991)				
構造	α 異性体 	β 異性体 	γ 異性体 	σ 異性体 
(LogKow)	(3.8)	(3.8)	(3.7)	(4.1)
BCF 値 グッピー	706	1043	697	648
ゼブラフィッシュ	1100	1460	850	1770
[EPI Suite 推算値]	[250]			
テブコナゾール (Liu <i>et al.</i> , 2016)				
構造	R 異性体 	S 異性体 		
(LogKow)	(3.7)			
BCF 値ゼブラフィッシュ	10.31–16.25		9.79–11.22	
[EPI Suite 推算値]	[128.3]			

このように、構造類似化合物などにおいても経験的な部分構造からの代謝も含めた補

正による予測に制約があることがうかがえ、代謝を考慮した BCF 推算式の記述子に上述のような異性体を識別するパラメータの組み込みが出来ていないのが現状と言える。

従って、先に述べたように、標準的 BCF 試験が高価で高度技術と時間を要す大規模なものであること、化学物質の安全性評価の厳格化や生物濃縮性懸念化学物質の規制強化と連動しマイナー成分・類縁体や構造類似代謝物などの評価も重要性を増していること、構造類似化合物間の BCF 評価では特に物化性の近似性からその BCF の違いには代謝の要因が重要であることなどから、動物愛護の観点からもデータのブリッジングなどを活用した生物濃縮性の評価手法が効率的であり、そのような簡便評価手法の蓄積が求められる。

1.4. 無脊椎動物の生物濃縮性評価

生物濃縮性の評価についてはこれまで歴史的に魚類が代表生物群として取り扱われているが、生態系ピラミッド・食物連鎖を考えると高次捕食者の餌生物となる一次消費者、二次消費者などの低次栄養段階の生物相の生物濃縮性評価が魚同様に重要と考えられる。この低次栄養段階生物相の多くが図3の例示の様に無脊椎動物と言える。

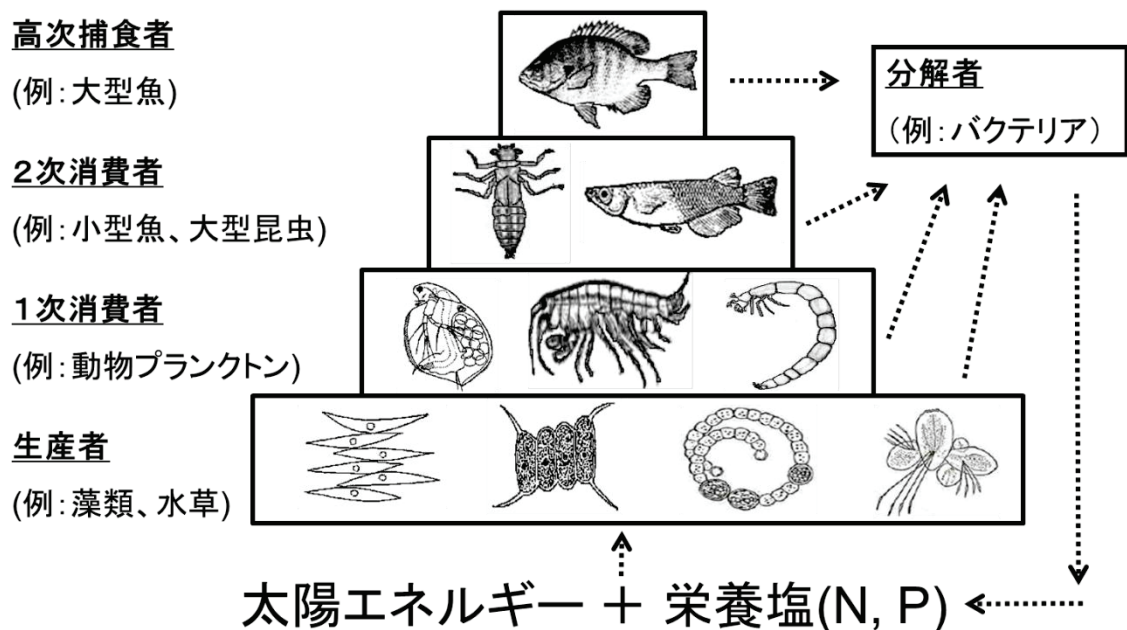


図3. 水圏生態系の模式図の一例 (宮本ほか, 2008)

前述のとおり無脊椎動物の生物濃縮性評価の標準試験法は現在のところ環形動物(ミミズ)や貝類(カキ)のみである。一方で、無脊椎動物の生物多様性・種数等を見ると、図4に例示するとおり、無脊椎動物のうちで種数・多様性から重要と考えられるのが昆虫類や甲殻類からなる節足動物と考えられる。

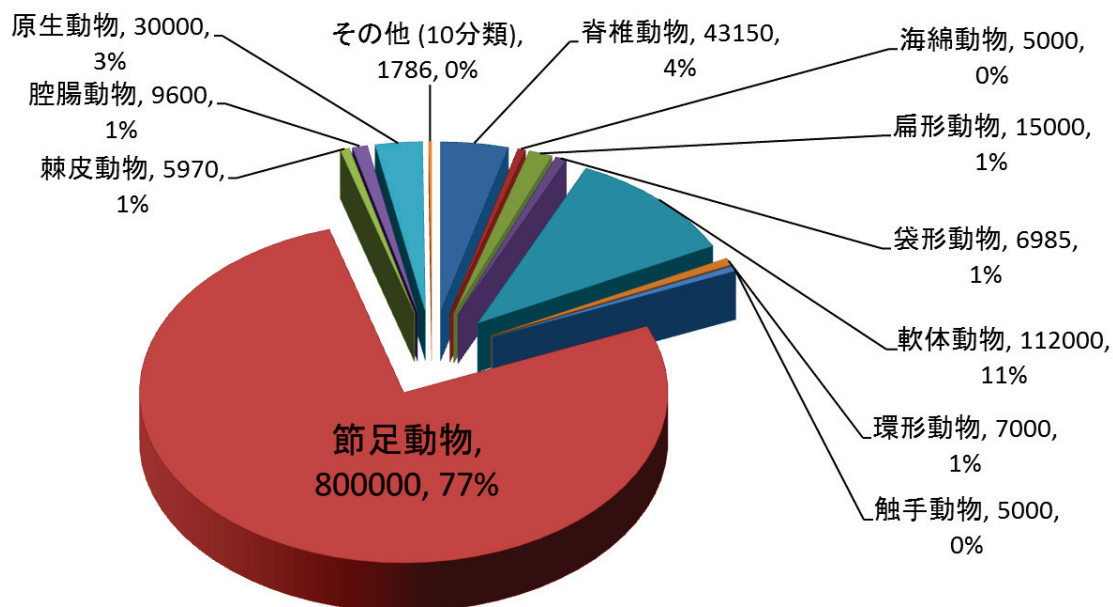


図4. 動物の主な分類と種数 (動物分類名辞典 (谷津ほか, 1972) より)

節足動物の生物濃縮性のデータもこれまでに多々取得されているものの、その生物種数および生理・生態の多様性に関連し標準試験法も確定されていないことに関連し、様々な実験条件に影響されて BCF データの脂溶性との相関には魚の上述のデータベースでのそれと比べて大きな変動があると言える。図5に、幾つかの化合物について昆虫類、甲殻類と魚類の BCF レベルをオクタノール/水分配係数 (K_{ow}) 値と併せて比較した。いずれの化合物においても昆虫や甲殻類の各分類および魚類で一定傾向や順位、序列は認められず、*p,p*-DDT では各生物分類群毎の幾何平均 BCF はおおむね 4~5 と類似しているものの、その他の化合物では生物分類間で最大約 2 (Chlorpyrifos) ~ 3 (Bis(2-ethylhexyl)phthalate と Hexachlorobenzene) 倍の違いが見られる。

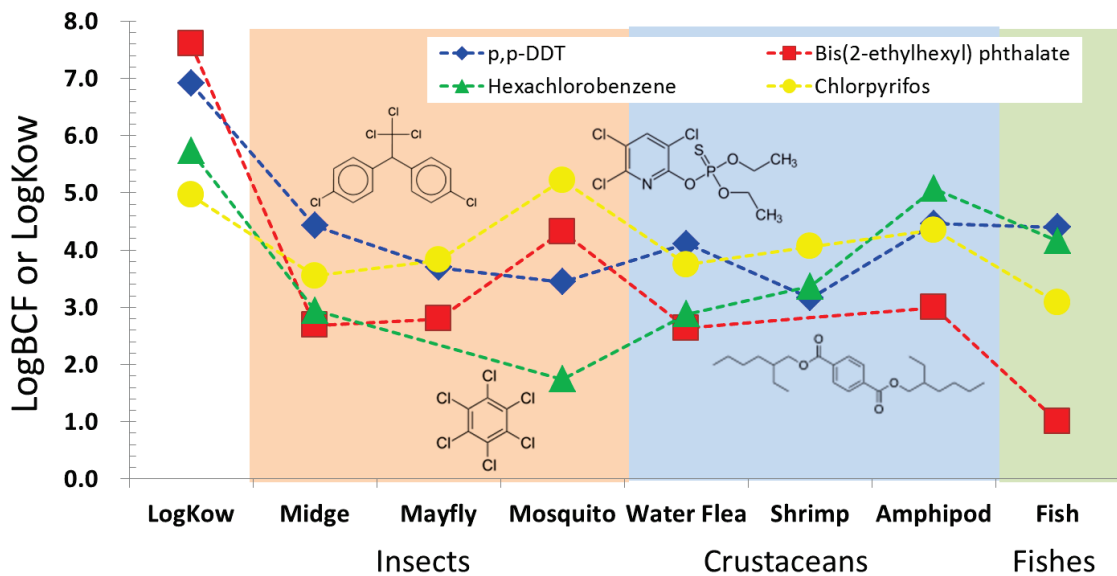


図 5. 幾つかの化合物 (Chlorpyrifos, *p,p*-DDT, Bis(2-ethylhexyl) phthalate, Hexachlorobenzene) における甲殻類、水生昆虫生物群、魚類の生物濃縮係数 BCF とオクタノール／水分配係数 (Kow) の変動性

甲殻類、昆虫類の BCF は US EPA(2015) のデータベース ECOTOX から検索し、各分類名から抽出した (曝露期間 24 時間以上の BCF 値を採用し同一分類では幾何平均値とした)。魚 BCF、Kow 値は図 2 と同一。

更に幅広い多種多様な化合物群に関する昆虫類、甲殻類、魚類の BCF データについて脂溶性 (Kow) との関係性や分類間の比較を図 6 に示すと、魚類と節足動物全体を比較すると、Kow の増大に伴う BCF 上昇が Kow=7 程度まで見られ、その後低下する傾向は一致するものの、上下に大きく逸脱するデータも多く、特に Kow=5~7 における上下の変動は顕著である。また、甲殻類と昆虫類に分けて比較した場合、幾分相関性は増加したものの依然 0.4 未満にとどまり、また相関性の傾きも 0.51 および 0.35 と大きな乖離が認められた。更に、各生物分類に細分化しても明確に精度良い相関性を示す分類は認められず、生物多様性を反映したものと推察された。

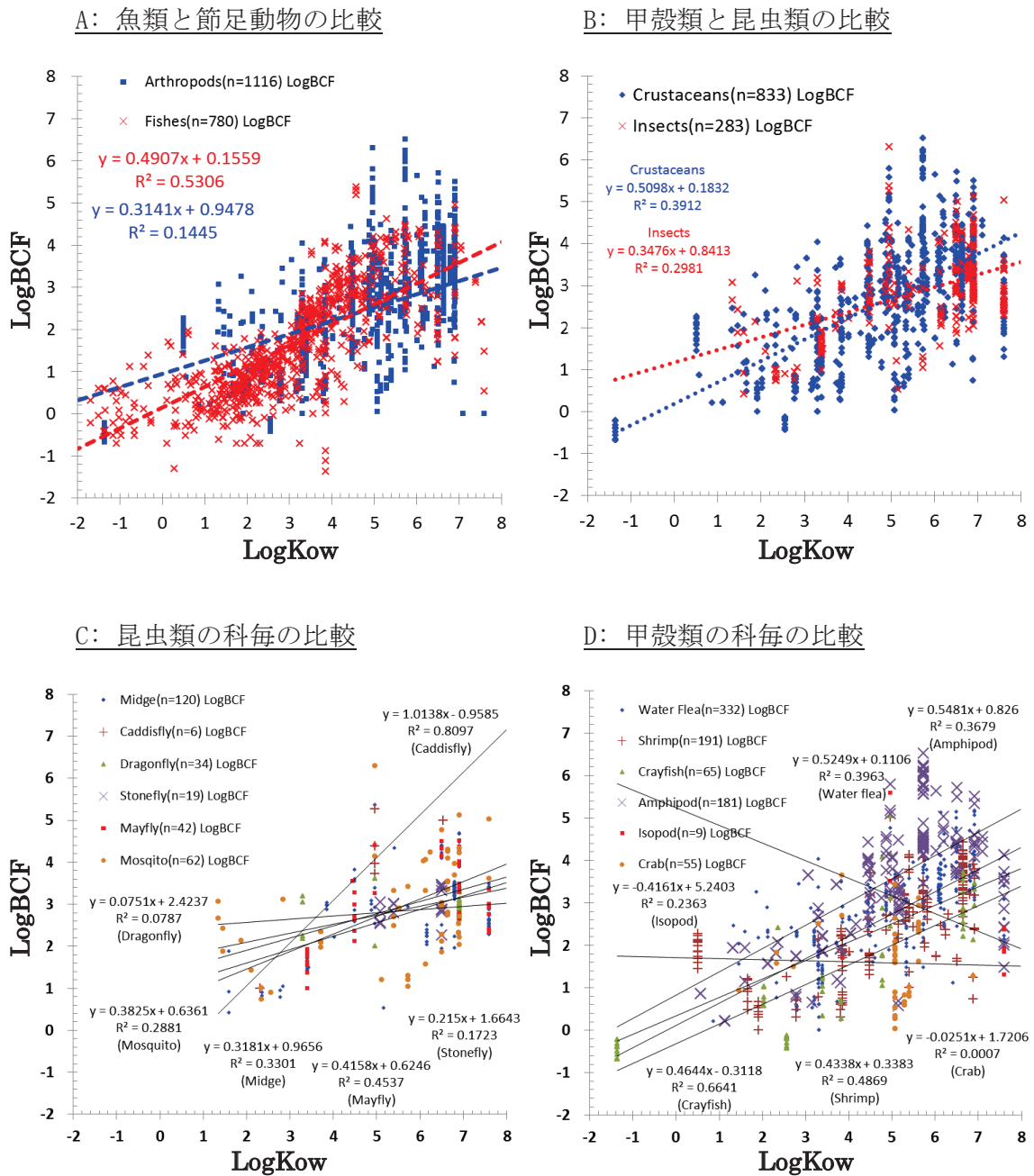


図 6. 甲殻類、昆虫類の生物濃縮係数 BCF とオクタノール／水分配係数(Kow)や魚 BCF との関係性

甲殻類、昆虫類の各分類 BCF は US EPA(2015) のデータベース ECOTOX から抽出し暴露 24 時間以上の値を採用。魚 BCF、Kow 値は図 2 と同一。

節足動物に関して、標準指標種や試験条件などを含めた標準試験法ガイドラインは未整備である。最近、欧米の生物濃縮性重視の姿勢や脊椎動物愛護の観点などからヨ

コエビを魚濃縮性スクリーニングへの活用の提案もみられるものの(Treu *et al.*, 2015)、現在のところガイドラインを整備する明確な動きも見受けられない。これは、実環境での食物連鎖も含んだ生物濃縮性が生態系の低次栄養段階の生物よりも高次捕食者(図3)でこれまでも顕著・甚大となっていること(湯嶋ほか, 1973; 山県, 1978)や、魚が我々人間の食料としても重要な位置づけにあり産業にも関連して材料や知見が豊富であることに加えて、節足動物群の生理・代謝・生態多様性等や変態・高成長速度・体サイズ・季節性なども関連した困難さも関連していると推測される。このような状況下での生態系や水産資源全体の保全を考えるための化学物質の生物濃縮性評価における節足動物など標準試験法が未整備の生物群の評価については、将来の検証・比較なども配慮し再現性や相互比較など工夫した簡易な関連データの活用が有用であると考える。

その1つに Lethal Body Residue (LBR または Critical Body Burden: CBB、Internal Effect Concentration: IEC、50% Lethal Residue level: LR₅₀ ; これまでのところ、これらの日本語での標準的に広く用いられている用語は認識されておらず、本論文では便宜的に表現として LBR あるい体内致死濃度を用いる) と毒性情報からの解析による BCF 評価が挙げられると考える。BCF と体内致死濃度および一般に広く用いられている半数致死濃度 (供試した半数の個体が斃死する暴露水中濃度、50% Lethal Concentration: LC₅₀) の関係については以下の関係性が提唱され(McCarty, 1986, 1987; Rand, 1995; Esher *et al.*, 2002; Kenneth *et al.*, 2010)、化学物質の毒性・作用性の種差や各種条件差の解析(van Wezel *et al.*, 1995; Fisher *et al.*, 1999; Deneer *et al.*, 1999; Escher *et al.*, 2010)や複雑な試験系で生物の化合物取込みプロセスが複雑な底生生物の毒性の解析(Lotufo, 1998; Mäenpää *et al.*, 2006; McElroy *et al.*, 2010)などの目的でこれまでも色々な研究がなされている。しかしながら、これまでの研究では BCF の推算に用いられた例は殆ど見られない(角埜, 2010)。

$$\text{LBR} = \text{BCF} \times \text{LC}_{50} \quad (\text{あるいは、} \text{LogLBR} = \text{LogBCF} + \text{LogLC}_{50})$$

これを变形すると以下のとおり BCF を LBR と LC₅₀ の関数で記述できる。

$$\text{BCF} = \text{LBR} / \text{LC}_{50} \quad (\text{あるいは、} \text{LogBCF} = \text{LogLBR} - \text{LogLC}_{50})$$

McCarty らは、EPA のファットヘッドミノーの急性毒性データと物理化学性質からの各種予測式を用い、比較的代謝を受けにくく特異な作用性を持たない麻痺作用毒性物質の稚魚での LBR として 2-8 あるいは 2.5 や 5 m mol/kg を挙げている(McCarty *et al.* ;

1992, 1993)。更に、LBR は各種毒性作用性に関連したターゲットサイトの致死濃度レベルとのバランスや代謝分解性などに関連し、その他作用性の各種化学物質の LBR はこれより低値が想定され、各種極性麻痺作用性物質、呼吸阻害性物質、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤ではそれぞれ 0.6-0.9、0.0015-0.2、0.05-2.7 m mol/kg などと見積もられている。図 7 に魚急性毒性 LC_{50} と BCF それぞれの対数値の関係の 1 例として、上記 LBR 値を踏まえた $\text{LogBCF}=\text{Log}(5\text{ m mol/kg})-\text{LogLC}_{50}$ の回帰直線と併せて示す。化学物質の作用性、生物種、試験温度、脂肪含有率など前述の様々な条件の違いによるデータの変動なども想定されるものの、上記の関係式がうかがえる。

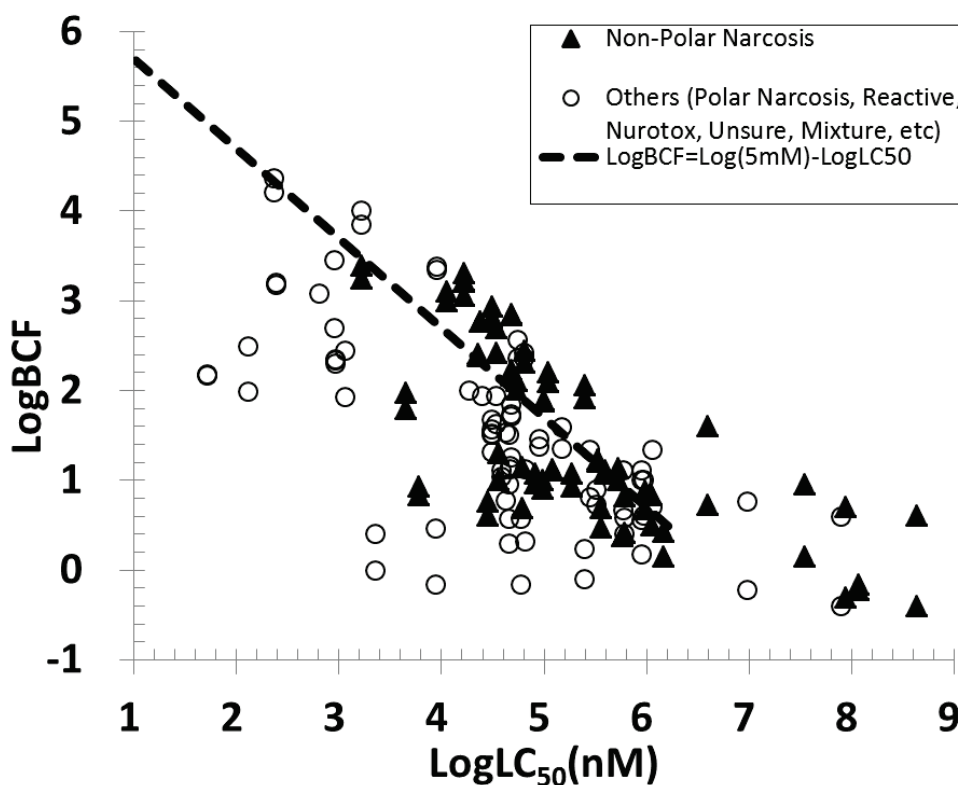


図 7. 魚における急性毒性値 (LC_{50}) と濃縮性 (BCF) の関係の一例

US EPA Mid-Continent Ecology Division (2015) のファットヘッドミノー急性毒性データベース中の LC_{50} 値 (複数データは幾何平均値) と CEFIC (2014) の LRI toolbox データベース中の BCF 値からグラフ化 (n=157)。毒性作用性と回帰式例を図示：1) 非極性麻痺作用 (Non-Polar Narcosis)、2) その他 (極性麻痺作用/反応性物質/神経毒性/アセチルコリンエステラーゼ阻害/呼吸阻害/不明/混合作用)、3) McCarty 例示 LBR=5 mM (非極性麻痺作用物質群) 回帰直線。

毒性値や体内致死濃度は比較的容易に類似条件下で様々な生物種のデータが採取できると考えられることから、生物種間の BCF の比較などにおいても活用性があると考えられる。節足動物の生物多様性も踏まえれば、標準試験法が未整備の下では、これら関連情報等からの各種生物の種間比較も含め濃縮性評価に有用と考えられる。

1.5. 本研究の目的

今後、更に必要性が増すと考えられる化学物質の生物濃縮性評価において、特に微量混在成分や分解物といった様々な類縁物質や、代謝要因などから既存の手法を用いた予測値の精度に制約がある場合に効率的に評価する手法、あるいは評価対象化合物群の中での優先順位付けを行うための手法、などの選択肢を増やすことは有益と考える。そのため、本研究は、生物濃縮性における代謝要因の有無を明らかにし、また簡便に代謝要因も考慮し類似物質でも精緻に予測・評価できる手法を構築するとともに、標準生物や標準手法も未整備にもかかわらず、生態系構造や生物多様性の観点からも重要と考えられる節足動物についても代謝差等も考慮した簡便評価手法を構築することを目的とした。

モデルとして被験物質に防疫薬用途のピレスロイド系殺虫剤である *m*-フェノトリン、テトラメトリンおよび農業用殺虫剤のピリダリルを用いた。ピレスロイドはその生物活性のみならず易分解性に関連した低環境負荷の特性から農業用途、防疫薬（殺生物剤）用途で重要な殺虫剤系統・分類の 1 つである (Gan *et al.*, 2008; Katagi, 2012; Roberts *et al.*, 1999; Leahey, 1985)。ピレスロイドは一般に疎水性であり高いオクタノール/水分配係数 (Kow) と低い水溶解度を有し、生物への高い濃縮の可能性を示唆する物理化学的な特性を有している。しかしながら、多くのピレスロイドでは、魚への生物濃縮係数 BCF 値が前述 (表 4) の Veith の提唱した初期の経験的な Kow を記述子とした回帰式 ($\text{LogBCF} = 0.85 \times \text{LogKow} - 0.70$) から推算される値よりも顕著に低値である。すなわち、LogKow が 4.53~7.00 のピレスロイド 8 剤の実側 BCF 値は 359~6090 であり、予測値 1400~180000 を大きく下回る (Laskowski, 2002; Muir *et al.*, 1994)。この違いは、比較的大きなピレスロイド分子の鰓の膜透過性の低さと魚における速やかな代謝によるとされている (de Wolf *et al.*, 1992; Arnot *et al.*, 2006; Katagi, 2010)。キク酸構造を有するピレスロイドの魚における代謝様式に関しては、

ピレスロイドの酸側、アルコール側の化学構造のみならずキク酸のシス、トランス幾何異性体構造も加水分解や酸化分解経路に影響することが知られており (Katagi, 2012; Takimoto *et al.*, 1986; Huckle *et al.*, 1990)、生物濃縮性への代謝要因の影響を検討する確かなモデル化合物群の 1 つと言える。また、ピリダリルについても疎水性が高く (LogKow=8.1) 生物濃縮性の検討に有用な材料と考えられる。

第 2 章では、まず生物濃縮性評価の標準試験法が未整備の水生甲殻類、昆虫類に関して評価手法の展開を図るべく簡便手法を構築するため、生態毒性評価標準種であるセスジユスリカ *Chironomus yoshimatsui* Martin & Sublette、ヨコエビの一種 *Hyalella azteca* Saussure について農業用殺虫剤ピリダリルの毒性、代謝様式、体内致死濃度の多様性を検討・評価した (Miyamoto *et al.*, 2010)。その結果を踏まえて生物濃縮係数の簡易推測を試み、更に実際の野外における水生甲殻類、昆虫類の濃縮・残留データから検証を行った。

第 3 章では、構造の近い類縁体などの生物濃縮性評価に関して、代謝要因を考慮した BCF 推算簡易手法を構築するため、テトラメトリンのトランス異性体について魚における濃縮代謝排泄挙動を詳細に *in vivo* 試験で評価・解析した。更に、トランス異性体およびシス異性体の *in vitro* 代謝速度を比較評価することにより得られた異性体間での代謝分解性情報と、トランス体の *in vivo* データを組み合わせテトラメトリンのシス異性体の生物濃縮性を検討した (Miyamoto *et al.*, 2015)。

第 4 章では、生物濃縮性へ代謝要因が大きく関わることを明確化、定量化する簡便手法を構築するため、シス、トランス異性体で代謝様式の異なる異性体混合物である *m*-フェノトリンを用いた魚における濃縮性試験において各成分の分別定量による同時評価から異性体間の濃縮性の違いを正確に評価した。更にシス体代謝分解のみに大きく関わる酵素系の阻害剤を同時暴露することによって BCF の変化を観察、解析した。これらのデータの比較解析を通じて代謝の関与と程度を明確化する手法の有用性を検討した (Miyamoto *et al.*, 1992)。

第 5 章では、総合考察として、上記実験の結果をまとめて生物濃縮性への代謝要因の影響を考察するとともに、今回検討した代謝要因影響の解明手法について類縁化合物群や多様な生物種群の生物濃縮性評価の簡易手法としての活用性や、現状の国際的研究動向なども踏まえての今後の展望について考察した。

第2章 生物・代謝多様性を踏まえ、体内致死濃度を活用した節足動物の簡便濃縮性

評価手法の検討

ー殺虫剤ピリダリルのセスジユスリカ、ヨコエビの一種の体内致死濃度を用いた BCF 推算の検討ー

2.1. 緒言

本章では、現在のところ生物濃縮性試験においては国際的な標準試験法がない生物群である節足動物のうち、生態毒性評価においては代表的な分類群であるユスリカおよびヨコエビをそれぞれ水生昆虫、水生甲殻類モデル生物種とした。代謝様式や関連した毒性差などの生物種差に関連したデータからの簡易な生物濃縮性評価手法の構築を試み、高脂溶性である農業用殺虫剤のピリダリルを題材化合物に用いて生物濃縮係数 (BCF) の簡便推算手法の検討を行った。

殺虫剤ピリダリル (2,6-dichloro-4-(3,3-dichloroallyloxy)phenyl 3-[5-(trifluoromethyl)-2-pyridyloxy]propyl ether, 図8) は綿、果樹、野菜の鱗翅目やアザミウマ目害虫用の新規農業用殺虫剤であり高脂溶性 (LogKow=8.1) の性質を有している (Sakamoto *et al.*, 2003; 坂本ほか, 2005; US EPA, 2008; FAMIC, 2009; EFSA, 2013)。

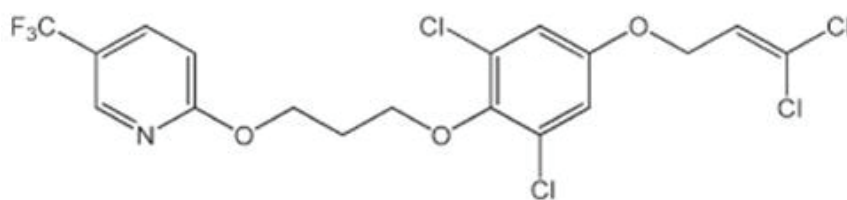


図8. ピリダリルの化学構造式

水生生物標準種におけるピリダリルの毒性値は魚類コイ、ニジマス、ブルーギルの 96hr-LC₅₀ はそれぞれ>10、0.5、>24 mg/L、オオミジンコ *Daphnia magna* Straus の 48hr-EC₅₀ は 0.0038 mg/L、ムレミカズキモ *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak の 72hr-ErC₅₀ が>10 mg/L であり、魚類や藻類に比べて水生無脊椎

動物はピリダリルに高感受性である。水生無脊椎動物は生態や生理に関して最も多様な分類群の1つであり (Barnes *et al.*, 1988; 宮本ほか, 2008)、また殺虫剤等に関しても種に依存した感受性差が知られている (von der Ohe *et al.*, 2004)。オオミジンコはその飼育の容易さや膨大な生態毒性データベースの存在等から化学物質の水生無脊椎動物への毒性指標種として用いられている (畠山ほか, 2003) が、一部の農薬などではユスリカ類等の他の無脊椎動物よりも顕著に低感受性であることが知られている (EC, 2002)。ユスリカ類やヨコエビ類は生態も農薬等への感受性もミジンコ類と異なることから他の重要な指標種と言える (ASTM, 1995)。近年、経済協力開発機構 (OECD) や米国の環境保護庁 (US EPA) や試験材料協会 (ASTM)、日本の農林水産省がこれらの生物種の毒性評価の標準試験法を推奨している (ASTM, 1995; OECD, 2004; US EPA, 1996b; 農林水産省, 2014)。

第1節では毒性並びに代謝、体内致死濃度の生物種間での違いについて比較検討を行い、第2節では得られたデータから BCF を簡易に推定すると共に、既存のピリダリルの野外における各種水生生物への濃縮、残留データとの比較検証を行った。

第1節 殺虫剤ピリダリルのセスジユスリカ、ヨコエビの一種に対する急性毒性と代謝

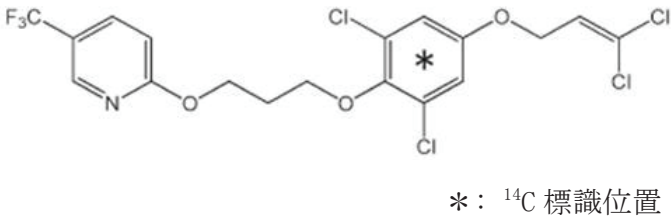
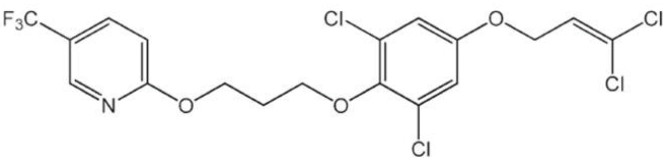
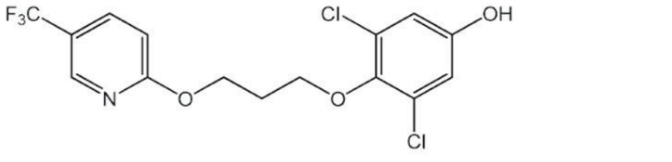
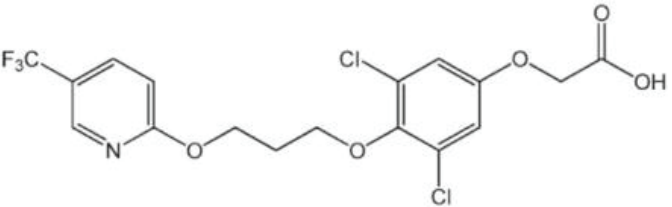
2.2.1. 材料と方法

2.2.1.1. 被験物質、代謝物標品ならびにその他試薬

被験物質のピリダリルはジクロロフェニル環を ^{14}C でユニフォーム標識化したもの (比放射能: 9.70-9.87 MBq/mg、表 6) および非標識のもの (住友化学製) を使用した。また、代謝物同定用標品としてジクロロプロペニル基が脱離した S-1812-DP およびカルボン酸に酸化された S-1812-Ph-CH₂COOH を用いた (表 6)。

生物飼育、試験水希釈水は脱塩素水 (上水を活性炭で脱塩素処理した水) を用いた。その他実験に使用した試薬は市販品を用いた。

表 6. 使用した被験物質、代謝物標品

化合物、略号	構造式	純度
[Phenyl- ¹⁴ C] ピリダリル	 <p style="text-align: center;">* : ¹⁴C 標識位置</p>	95.7-97.1% (放射化学的)
ピリダリル		92.4%
S-1812-DP		98.8%
S-1812-Ph- CH2COOH		98.0%

2.2.1.2. 供試生物

双翅目昆虫、セスジユスリカ幼虫および北米原産の甲殻類端脚目、ヨコエビの一種を供試生物として用いた。それらはそれぞれ国立環境研究所（茨城県）と Springborn Smithers 研究所（米国、マサチューセッツ州）から入手し、実験室内で継代飼育（23℃、照明 16 時間明/日、テトラミン給餌）したカルチャー内の個体（図 9）を用いた。セスジユスリカは 3 齢幼虫を、ヨコエビの一種は成体を供試した。



セスジユスリカ

ヨコエビの一種

図 9. 供試生物のセスジユスリカ *Chironomus yoshimatsui* およびヨコエビの一種 *Hyaletta azteca*

2.2.1.3. 生物暴露試験

2.2.1.3.1. セスジユスリカ急性毒性・代謝／体内濃度評価試験

セスジユスリカの試験は止水下、48 時間（蛍光灯下 16 時間照明/日）、底質なしの暴露条件下で行った。被験物質のピリダリルを希釈水である脱塩素水に均一分散させ試験水を調製した。そのために、溶解助剤として DMF (*N,N*-ジメチルホルムアミド)/HCO-40(硬化ヒマシ油) (=1/1, w/w) の混合溶媒を用いた。毒性評価と併せて体内残留濃度、代謝物分析を行うために ^{14}C 標識被験物質を供試した。試験液の比放射能を調整するために ^{14}C 標識被験物質および非標識被験物質のストック液を定量的に混合し目的の比放射能および設定暴露濃度 (0.010、0.032、0.10、0.32、1.0、3.2、10 mg/L) の試験液を各 1 連作製した。希釈水のみは無処理対照区および助剤対照区を併せて設置した。試験容器は 1 L 容ガラスビーカーを用い、500 mL の試験液を満たし恒温水槽 ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) に設置し、供試生物 10 個体を導入して暴露を開始した。暴露期間中は定期的に試験水中被験物質濃度、水質 (DO、pH、水温) を測定した。更に供試生物の毒性症状および死亡 (一般的生態毒性試験法 (ASTM, 1996) に従い、刺激による応答の欠如を実務的に死亡とした) の有無を 24 時間毎に観察し、死亡個体および暴露終了時の個体は採取後に体内濃度、代謝物分析に供した。暴露期間中は無給餌とした。

2.2.1.3.1. ヨコエビ急性毒性試験および体内濃度・代謝評価試験

ヨコエビの試験はセスジユスリカの試験と類似の条件下で行った。但し、暴露期間を96時間とし、2連設置し試験容器内に供試生物を安静化させる生息基質としてステンテスマッシュ（約2×3 cmサイズ）を設置し、試験液量1 Lで48時間毎に試験液を交換する半止水条件とした。更に、急性毒性LC₅₀評価のdose-response試験（設定暴露濃度0.010、0.020、0.040、0.080、0.16 mg/L）と体内濃度・代謝評価のための1濃度暴露試験（設定暴露濃度0.010 mg/L）の2つに分けて行った。前者は被験物質として非¹⁴C標識被験物質を用い、後者では代謝物の同定、定量のために¹⁴C標識被験物質とした。

2.2.1.4. 化学分析

セスジユスリカ暴露試験における暴露水や供試生物の有機溶媒抽出物や抽出残渣サンプルの放射能(¹⁴C)量は液体シンチレーションカウンター(LSC、パッカード製、2000CA型あるいは2900TR型)を使用し、LSCカクテルとしてEmulsifier-Scintillator 299™を用いた。生物未抽出残渣サンプルはサンプルオキシダイザー（パッカード社製、Tri-Carb 307型）により燃焼し¹⁴CO₂をトラップ剤Carbosorb®（パッカード）で捕集（¹⁴C回収率96.6-97.0%）しLSC測定に供した。暴露水、生物中の各¹⁴C成分（被験物質、代謝物）分析は溶媒抽出サンプルの薄層クロマトグラフィー（TLC）により行い（メルク製、Silica gel 60F₂₅₄ chromatoplate、20 x 20 cm、0.25 mm）、トルエン/酢酸（7/1, v/v）の展開溶媒系を用いた（R_f値：ピリダリル、S-1812-DP、S-1812-Ph-CH₂COOHそれぞれ0.66、0.21、0.18）。¹⁴C成分の定量にはBAS-IIIIs フジイメーキングプレート（富士フィルム）とバイオイメーキングアナライザーTyphoon 9200（アマシャム・バイオサイエンス社）を用いた。暴露水サンプル（5-7 mL）は酢酸エチル 3-5 mL で2回抽出後TLC分析に供し、生物サンプルは10-20 mg程度にまとめて秤量（メトラードレド製AE200型）し、0.005%HC1含有アセトニトリル 2 mL 添加後ホモジナイズ（Heiden 製1200GP モーターおよび 20 mL ガラスチューブ）し、更に超音波処理（Branson 製Ultrasonic Cleaner1200型）後に遠心分離した上清として抽出した。TLC分析において原点付近に見られた極性成分は抱合体と予想され、スポット部分を掻き取り酸加水分解（6M HCl、80℃下2時間）後TLC分析により遊離したアグリコンをTLC分析によ

り同定した。

ヨコエビ暴露試験における暴露水や供試生物の分析はユスリカ試験と類似の方法で行った。但し、試験液調製を簡便に実施するために非¹⁴C 標識被験物質を用いて実施した LC₅₀ 評価の dose-response 試験の暴露水分析は溶媒抽出（試験液 30 mL を 5 mL ヘキサンで 2 回抽出後濃縮乾固後アセトニトリルで再定容）後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により行った。島津製作所製 Prominence モデル HPLC システムと分析カラムに Sumipax ODS A-212 カラム（住化分析センター製、5 μm、6 mm×15 cm）を用い、アイソクラティック分析（移動相アセトニトリル/水=98/2、流速 1.0 mL/min、ピリダリル保持時間約 7 min）により UV210 nm で検出し定量した（検量線範囲 0.30-10 mg/L、 $r^2=0.998$ ）。

2.2.1.5. 統計解析

供試生物の 50%が死亡する水中暴露濃度、LC₅₀ (OECD, 1992)、あるいは体内濃度 LBR (Lotufo, 1998; Hwang *et al.*, 2001; Wilcoxon *et al.*, 2003; Mäenpää *et al.*, 2006; Schuler *et al.*, 2009) を回帰分析により推算した。水中暴露濃度、体内濃度は平均値を用い、回帰分析にはプロビット法を用いた。計算プログラムとして Ecotox-Statics ver. 2.3（日本環境毒性学会）あるいは Probit program (US EPA) を用いた。

2.2.2. 結果

2.2.2.1. 急性毒性

セスジユスリカ、ヨコエビ試験とも暴露期間中の水質は良好に維持され（水温：22.6-23.3°C、DO：7.9-8.7 mg/L、pH：7.4-7.9）、また水中のピリダリル濃度は安定的に維持され平均濃度は設定のそれぞれ 87-100%、84-100%であった（表 7）。

いずれの生物においても試験濃度範囲において明確な用量相関性を示し、死亡率はセスジユスリカでは 0-100%、ヨコエビでは 30-95%であった（表 7、図 10）。セスジユスリカの 48hr-LC₅₀ 値は 1.1 mg/L（95%信頼限界 0.76-2.0 mg/L）と、ヨコエビの 96hr-LC₅₀ 値は 0.015 mg/L（95%信頼限界 0.0080-0.022 mg/L）と推算された。

表 7. セスジユスリカ *Chironomus yoshimatsui*、ヨコエビの一種 *Hyalella azteca* 急性
毒性試験結果

供試生物	試験区	平均水中濃度 (mg/L) [設定%]	累積死亡率 (%)			
			24hr	48hr	72hr	96hr
セスジユスリカ	無処理対照区	<0.0010 [—]	0	0	—	—
	助剤対照区	<0.0010 [—]	0	0	—	—
	0.010 mg/L	0.0088 [88%]	0	0	—	—
	0.032 mg/L	0.032 [100%]	0	0	—	—
	0.10 mg/L	0.087 [87%]	0	0	—	—
	0.32 mg/L	0.32 [100%]	0	0	—	—
	1.0 mg/L	0.93 [93%]	0	30	—	—
	3.2 mg/L	3.0 [94%]	20	100	—	—
	10 mg/L	8.8 [88%]	60	100	—	—
ヨコエビ	無処理対照区	<0.0030 [—]	0	5	5	5
	助剤対照区	<0.0030 [—]	0	5	5	5
	0.010 mg/L	0.0084 [84%]	0	0	25	30
	0.020 mg/L	0.019 [95%]	40	40	45	65
	0.040 mg/L	0.041 [100%]	50	55	70	80
	0.080 mg/L	0.080 [100%]	55	60	80	95
	0.16 mg/L	0.15 [94%]	60	60	80	95

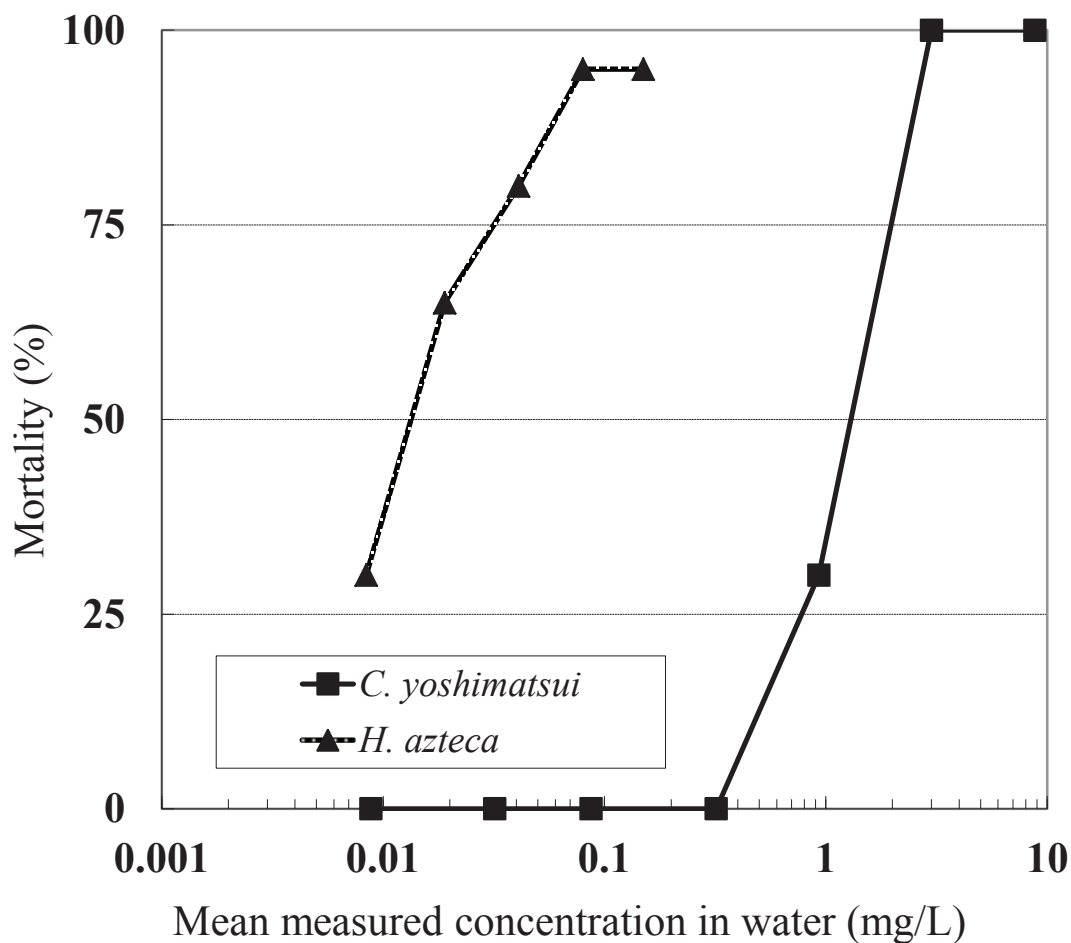


図 10. セスジユスリカ、ヨコエビの一種のピリダリルに対する急性毒性試験における
暴露濃度と死亡率の用量相関

- : セスジユスリカ、
- ▲ : ヨコエビの一種

2.2.2.2. 代謝様式ならびに体内濃度

セスジユスリカにおいては、主要代謝物として S-1812-DP とその抱合体が何れも最大で全 ^{14}C (Total Radioactive Residue、TRR) の 30%以上認められ、10%未満の代謝物として S-1812-Ph-CH₂COOH が認められた。ピリダリルは TRR の 14–67%に留まり、死亡の認められない低暴露濃度で顕著であった (0.032–0.32 mg/L 暴露区で 14–29%、0.93–8.8 mg/L 暴露区で 39–67%、図 11、表 8)。ユスリカ体内のピリダリルあるいは TRR 濃度は死亡率と明確に用量相関性が認められ、死亡の認められた濃度区におけるピリダリル体内濃度は 69–140 mg/kg に達し (図 12)、LBR 値はそれぞれ 79 (95%信頼

限界：53-110 mg/kg)、116 (95%信頼限界：110-122 mg/kg) mg/kg と推算された。

一方、ヨコエビの一種における主要代謝物はセスジユスリカと類似し S-1812-DP と抱合体であったものの S-1812-Ph-CH₂COOH は認められなかった。更に主要代謝物も TRR の10%未満に留まり、ピリダリルが TRR の84~88%を占め(図 11、表 8)、部分的に死亡の認められた 0.0093 mg/L 暴露区でのピリダリルの体内濃度は生残個体、死亡個体で 17~19 mg/kg であった。

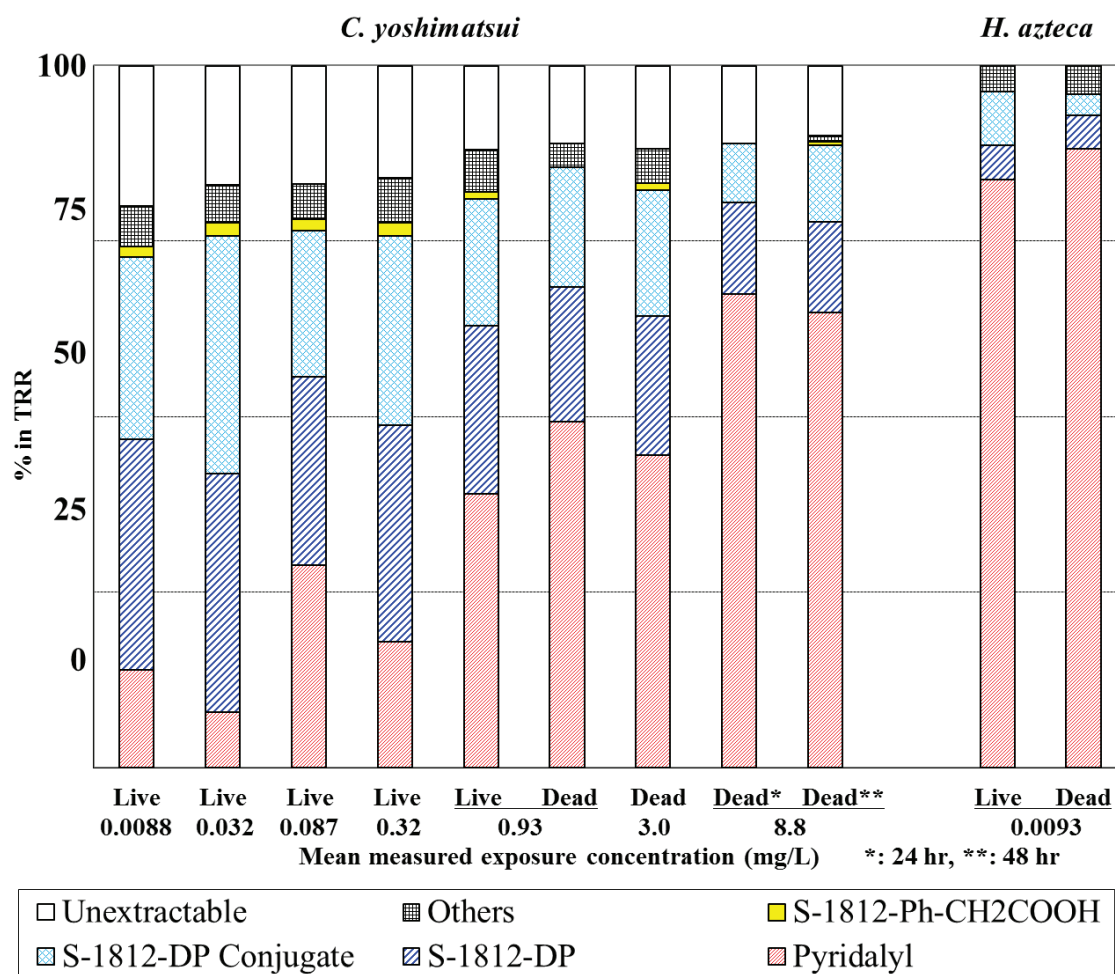


図 11. セスジユスリカ、ヨコエビの一種のピリダリル急性毒性・代謝試験における体内の被験物質およびその代謝物割合

表 8. ピリダリル暴露時のセスジユスリカ、ヨコエビの一種の体内の代謝物分析結果

	生物体内濃度, mg eq/kg (TRR%) [§]							ヨコエビ <i>H. azteca</i>
	セスジユスリカ							
設定試験濃度 (mg/L)	0.01	0.032	0.1	0.32	1	3.2	10	0.01
平均実測濃度 (mg/L)	0.0088	0.032	0.087	0.32	0.93	3.0	8.8	0.0093
サンプル湿重量 (mg)	18.9 ^{a)}	18.9 ^{a)}	19.0 ^{a)}	16.8 ^{a)}	13.1 ^{a)} , 6.6 ^{b)}	11.1 ^{b, d)}	19.6 ^{e)} , 7.1 ^{b)}	26.3 ^{a)} , 16.8 ^{f)}
全 ¹⁴ C (TRR)	4.9	11	26	85	[150] ^{e)}	320	[370] ^{e)}	[21] ^{e)}
未抽出残渣画分	0.96 (20)	1.9 (17)	4.4 (17)	14 (16)	170, 140 [18]	27	260, 480 [39]	22, 19 [0.013]
抽出画分	3.9	9.3	22	71	20(12), 16(11) [140]	(8.7)	23(8.7), 54(11) [330]	0.011(0.1), 0.016(0.1) [21]
ピリダリル	0.66 (14) ^{f)}	0.89 (7.9)	7.6 (29)	15 (18)	150, 130 [69]	180	240, 420 [240]	22, 19 [18]
S-1812-DP	1.6 (33)	3.8 (34)	7 (27)	26 (31)	67(39), 71(49) [32]	51	160(61), 320(6.7) [49]	19(84), 17(88) [1.0]
S-1812-DP抱合体	1.3 (26)	3.8 (34)	5.4 (21)	23 (27)	41(24), 22(19) [28]	45	33(12), 64(13) [39]	1.1(4.9), 0.92(4.8) [1.1]
S-1812-Ph-CH2COOH	0.072 (1.5)	0.2 (1.8)	0.42 (1.6)	1.6 (1.9)	10(6.0), 4.8(3.4) [1.0]	3.2	3.7(1.4), nd(-) [1.9]	- Nd(-), nd(-)
Others	0.29 (5.9)	0.62 (5.5)	1.3 (5.1)	5.5 (6.5)	[7.4]	8.9	[3.2]	[0.80]
						(2.8)	6.3(2.4), nd(-)	0.82(3.7), 0.78(4.0)

§ : 生物サンプル中の全¹⁴Cに対する各成分の%値。

a) 暴露終了時生残個体、b) 暴露終了時死亡個体、c) 2サンプルの算術平均値、d) サンプル量 (暴露24時間) の制約から分析せず、

e) 死亡個体 (暴露24時間)、f) 暴露72と96時間の死亡個体 (各4個体) を合わせたサンプル、f) カッコ内の値は全¹⁴Cに対するパーセント。

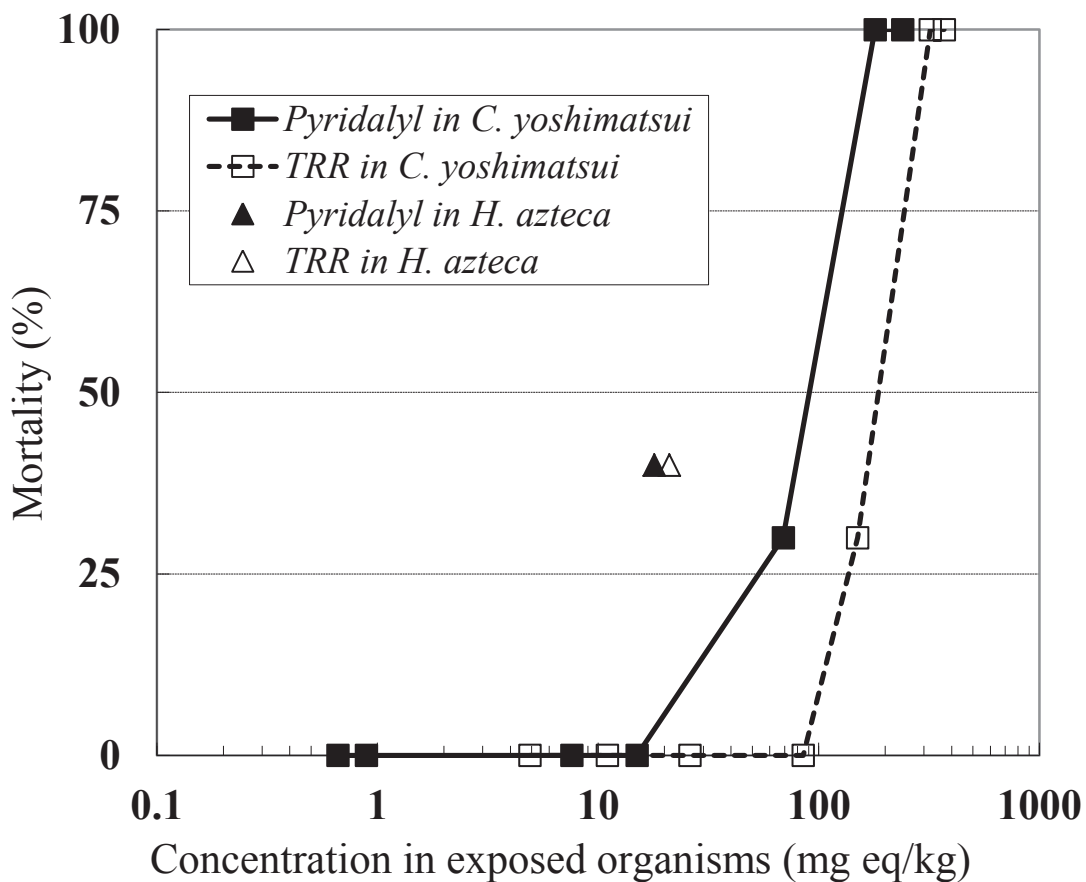


図 12. ピリダリルのセスジユスリカ、ヨコエビの一種の急性毒性試験における体内被験物質濃度と死亡率の用量相関

■ : セスジユスリカ体内ピリダリル濃度、□ : セスジユスリカ体内全 ^{14}C 濃度、▲ : ヨコエビ体内ピリダリル濃度、△ : ヨコエビ体内全 ^{14}C 濃度

また、セスジユスリカについては水中暴露濃度と体内濃度の相関をより詳細に解析したところ（図 13）、死亡個体における濃度飽和、致死レベル未満の低暴露濃度においては、体内ピリダリル濃度は水中濃度にはほぼ正比例し、累乗相関式の指数は 1.03 と 1 に近似し、係数は 61 であった。すなわち水中濃度の概ね 61 倍の体内濃度の相関が得られた。

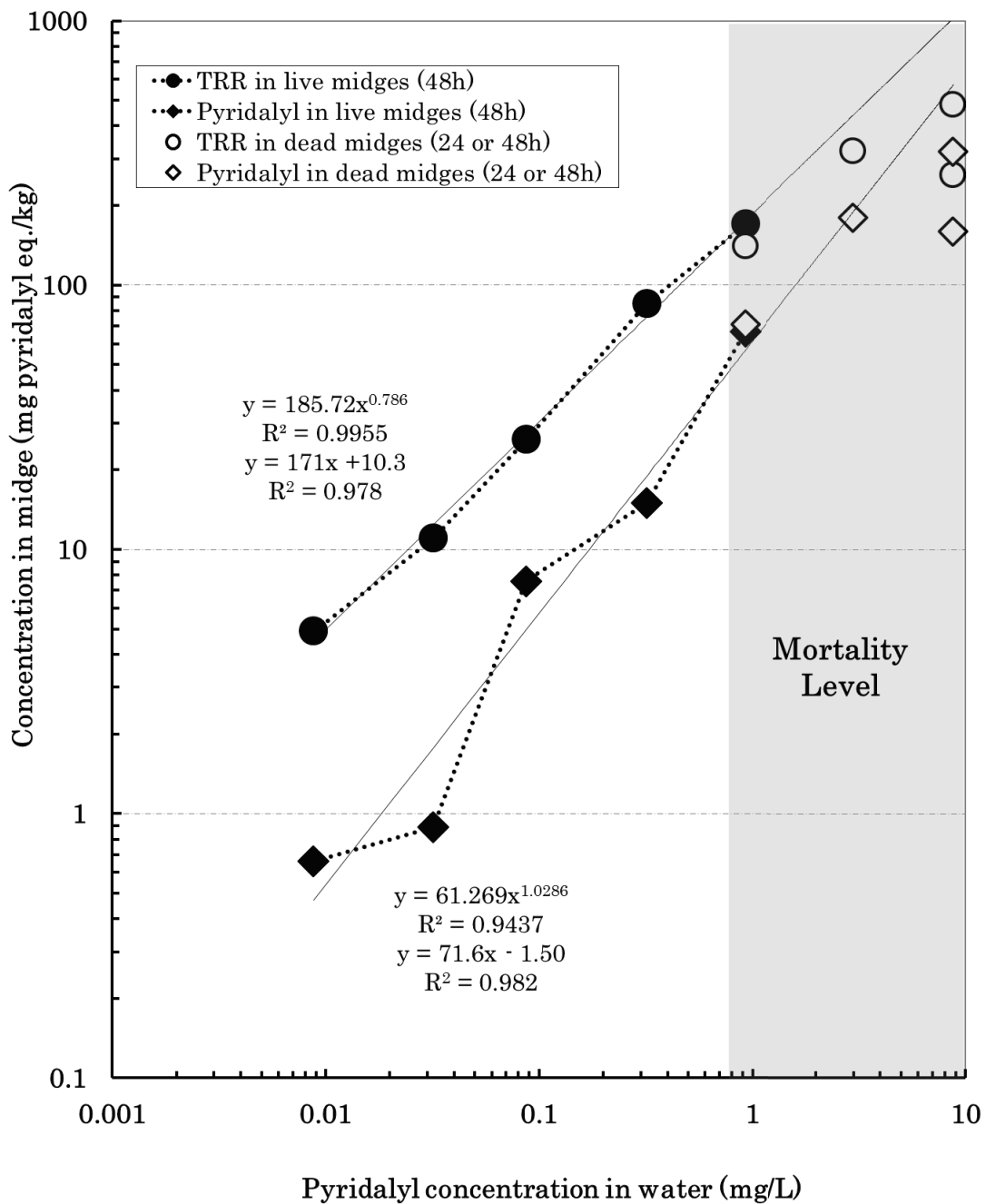


図 13. ピリダリルのセスジユスリカ急性毒性・代謝試験における水中暴露濃度と体内の全 ^{14}C およびピリダリル濃度の相関

◆ : 生残セスジユスリカ体内ピリダリル濃度、◇ : 死亡セスジユスリカ体内ピリダリル濃度、● : 生残セスジユスリカ体内全 ^{14}C 濃度、○ : 死亡セスジユスリカ体内全 ^{14}C 濃度

2.2.3. 考察

セスジユスリカおよびヨコエビの一種において同定された代謝物から推定されたピリダリルのこれら2種の水生昆虫、甲殻類における推定代謝経路を図14に示す。これら代謝物はいずれもピリダリルの哺乳動物や植物においても認められたものであった(坂本ほか, 2005)。

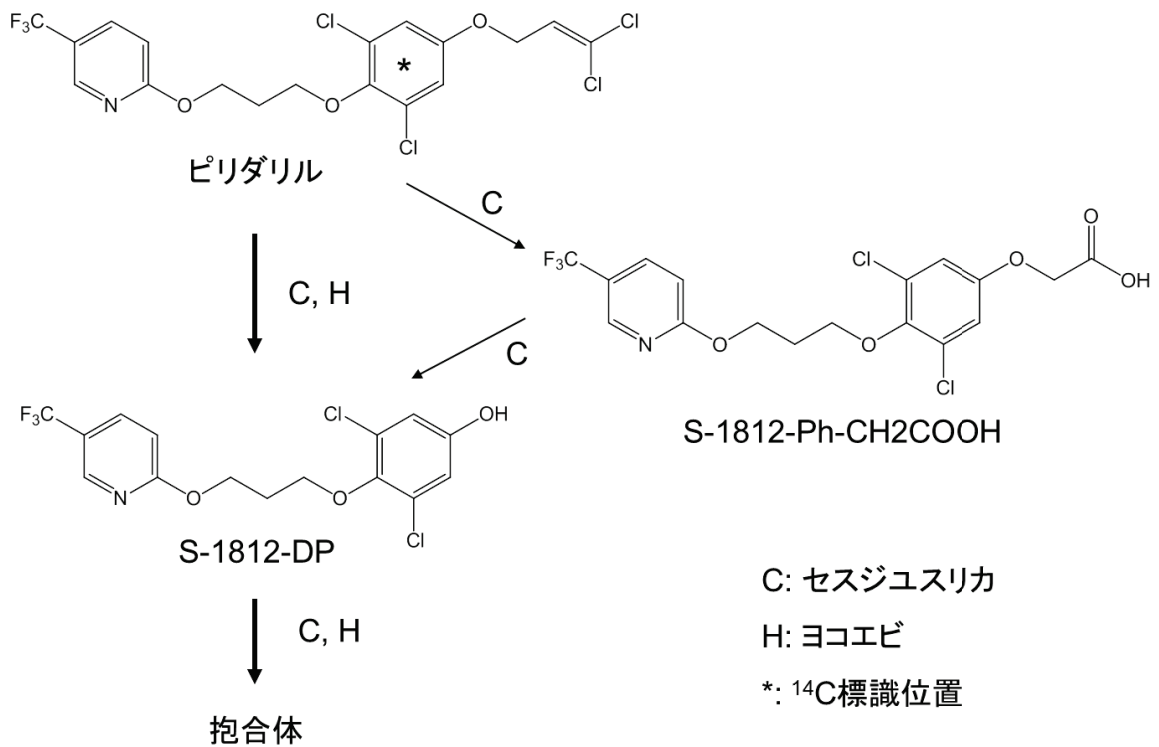


図14. ピリダリルのセスジユスリカおよびヨコエビの一種における推定代謝経路

ピリダリルのセスジユスリカとヨコエビの一種に対する急性毒性は顕著に異なり LC₅₀ 値としてヨコエビが 70 倍高感受性であった。既存データのオオミジンコ (48hr-EC₅₀=0.0038 mg/L) と比較すると、何れも低感受性であるものの同じ甲殻類のヨコエビでは比較的近似し 4 倍以内の違いであり生物種間の感受性差はもとより昆虫類と甲殻類での違いの可能性も予想された。一般的な感受性順列として端脚目 (ヨコエビ) > 枝角亜目 (ミジンコ) > 双翅目類 (ユスリカ) が提唱されており (von der Ohe *et al.*, 2004)、ピリダリルにおいても概ね一致するもののヨコエビとミジンコについ

てはオーダーを超える違いはないもののこの順列とは一致しなかった。

生物種間の毒性の違いには生物種体内のターゲットサイトの作用性の他に、取込みや分布、代謝、排泄挙動の違いによる暴露水中濃度に対する体内レベルの違いなどの要因が挙げられる。ピリダリル暴露水中濃度に対するセスジユスリカとヨコエビの一種の体内全¹⁴C濃度を単純比較した場合、代謝物各成分の排泄挙動等により正確な評価はできないものの、それぞれ 270-560、2300 倍でありヨコエビにおいて明確に高値である。このヨコエビにおける高値の要因には高取込み、低排泄性の可能性が考えられるものの、その違いは数倍に留まり 70 倍の感受性差の説明には不十分であった。更に、体内のピリダリル濃度と代謝物割合を比較するとセスジユスリカにおいて代謝物の割合が顕著であり、この代謝能による体内ピリダリル濃度低下が低感受性の大きな要因になっていることが示唆された。ヨコエビの体内濃度については 25%死亡レベル 1 濃度のみであるが当該濃度区の生残個体、死亡個体の体内ピリダリル濃度が 17~19 mg/kg (平均値 18 mg/kg) であることから LBR 値も近似するものと考えられ、セスジユスリカの LBR 値 (79 mg/kg) と同一オーダーであり両種の体内致死レベルとしては顕著な差はないと考えられた。従って、感受性差には代謝能の違いが大きな役割を果たしていると考えられた。なお、有機リン系殺虫剤など一部の特異的ケースは知られているが、一般に農薬等の代謝物では親化合物に比べて顕著に毒性が弱いことが知られている (Boxall *et al.*, 2004; Miyamoto *et al.*, 2013)。ピリダリルにおいてもその代謝物である S-1812-DP および S-1812-Ph-CH₂COOH のオオミジンコ急性毒性 48h-EC₅₀ はそれぞれ 0.36、7.6 mg/L と報告されており (EFSA, 2013) ピリダリル (48h-EC₅₀=0.0038 mg/L) に比べてそれぞれ 95、2000 倍低毒性であり、これら代謝物のセスジユスリカやヨコエビの一種で認められたピリダリルの毒性への関与の可能性は極めて低いと考えられた。

体内致死濃度に関連して、これまでも魚、甲殻類、貧毛類、水生昆虫など様々な生物群を用いて化学物質の潜在的な毒性解明の研究などが行われているが (Lotufo, 1998; Hwang *et al.*, 2001; Wilcoxon *et al.*, 2003; Mäenpää *et al.*, 2006; Schuler *et al.*, 2009)、本研究のような複数の生物種を類似条件下で直接比較したものは少なく、毒性あるいは生物濃縮性など関連した特徴の種間差研究には有用と考えられる。

第2節 殺虫剤ピリダリルのセスジユスリカ、ヨコエビの一種の BCF 推算と野外での 無脊椎動物生物濃縮データとの比較

2.3.1. 材料と方法

2.3.1.1. セスジユスリカおよびヨコエビの一種の BCF 推算

セスジユスリカおよびヨコエビの一種の BCF 推算は第1章で記した以下の式1から行った。LC₅₀および LBR 値は第1節の実験で得られた値を用い、ヨコエビの LBR については死亡率が25%における生残個体と死亡個体の体内濃度も殆ど違いが認められなかったことから、それらの平均値とした。

$$BCF = LBR / LC_{50} \quad (\text{式 1})$$

2.3.1.2. BCF 推算値と野外でのピリダリルの各種生物中残留濃度データとの比較

野外水系でのピリダリルの甲殻類、水生昆虫への生物濃縮挙動データの例として、ピリダリルの欧州食品安全庁(European Food Safety Agency, EFSA)の評価書(EFSA, 2013a)中で報告されている野外実験池での生物中残留濃度測定データがある。すなわち、天然水と底質を導入した9m×9m×2mH コンクリート池中に設置した直径2m×水深1mサイズ(3.14 m³)のステンレススチール製円筒で作製した実験区画(マイクロコスム)内で¹⁴C標識化(ジクロロフェニル環のユニフォームラベル)したピリダリルを1回水面散布処理後の甲殻類、水生昆虫を含む各種水生生物における経時的な体内濃度推移を評価している。各種生物のうち大型動物プランクトンは水層からの100 μmメッシュで採取した個体群であり主にミジンコ類と推察され、また水生昆虫のヤゴ(種不詳)も評価している。そこで、このデータを用いてそれぞれ甲殻類と水生昆虫の1例として非平衡条件下の濃度推移データからBCFの推定を試みた。同様にマイクロコスム内水層生息域のケージ内などから採取された巻貝サンプルおよびヒルやミズムシなど雑多な生物群混合サンプルデータもあることから、代謝能と濃縮性の比較参考として併せて解析した。

¹⁴C標識化したピリダリルを被験物質として供試しており、ピリダリルのみならずその他代謝分解物も含めた全¹⁴C濃度も水中および各種生物中とも測定されており、それ

ら濃度推移データ概要を図 15 に示す。

ピリダリルは、野外実験池への水面散布処理の後、水中から種々の生物や底質・浮遊物質などに移行・分解し、結果として水中や各生物中においてピリダリル分解物の生成が認められている。野外生態系での試験であり、捕食・被食関係も含まれることから本来は生息水のみならず食物連鎖も含めた生物濃縮である Bioaccumulation の評価となる。しかしながら、3週間と短期間の評価期間であり経口による寄与は限定的と推測（水生生物の定常的な呼吸の水量に比べると経口摂取での摂餌率には制約があり、短期間では経口摂取での濃縮は比較的遅い）され、水からの取込みが主要な BCF とした。また水中濃度も半減期約 0.7 日で極めて速やかに減衰し、同様に動物プランクトンやヤゴなどの各種生物の体内濃度も半減期 3.5~8.7 日で速やかに減衰する非平衡状況であることなどから生物体内濃度の主要因は初期の高濃度水暴露と推察された。生物濃縮係数 BCF の正確な解釈には制約があることから、便宜的に時間加重平均暴露水中濃度に対する各生物サンプルの見かけの BCFa (apparent BCF) に基づく解析、生物間の比較を行った。すなわち、暴露濃度が一定でなく初期の高濃度の暴露が最も影響を及ぼしていると考えられることから水中濃度減衰過程での効果も考慮するために暴露期間全体の時間加重平均暴露水中濃度に対する濃縮係数を算出した。

BCFa は生物中濃度を時間加重平均水中濃度で除して算出し、更に、上記 2.3.2.1. で算出した実験室における標準生物の BCF 推算値と比較した。なお、時間加重平均水中濃度 ($TWAC_{w(1-n)}$) は以下の式に従った (OECD, 2012a)。

$$TWAC_{w(1-n)} = \sum [(C_{w(m-1)} - C_{w(m)}) / \{\ln(C_{w(m-1)}) - \ln(C_{w(m)})\} \times (t_{(m)} - t_{(m-1)})] / (t_{(n)} - t_{(1)})$$

ここで、 $C_{w(m)}$: サンプル m 時点 ($m=1 \sim n$) での水中濃度、

$t_{(m)}$: サンプル m 時点 ($m=1 \sim n$) での時間。

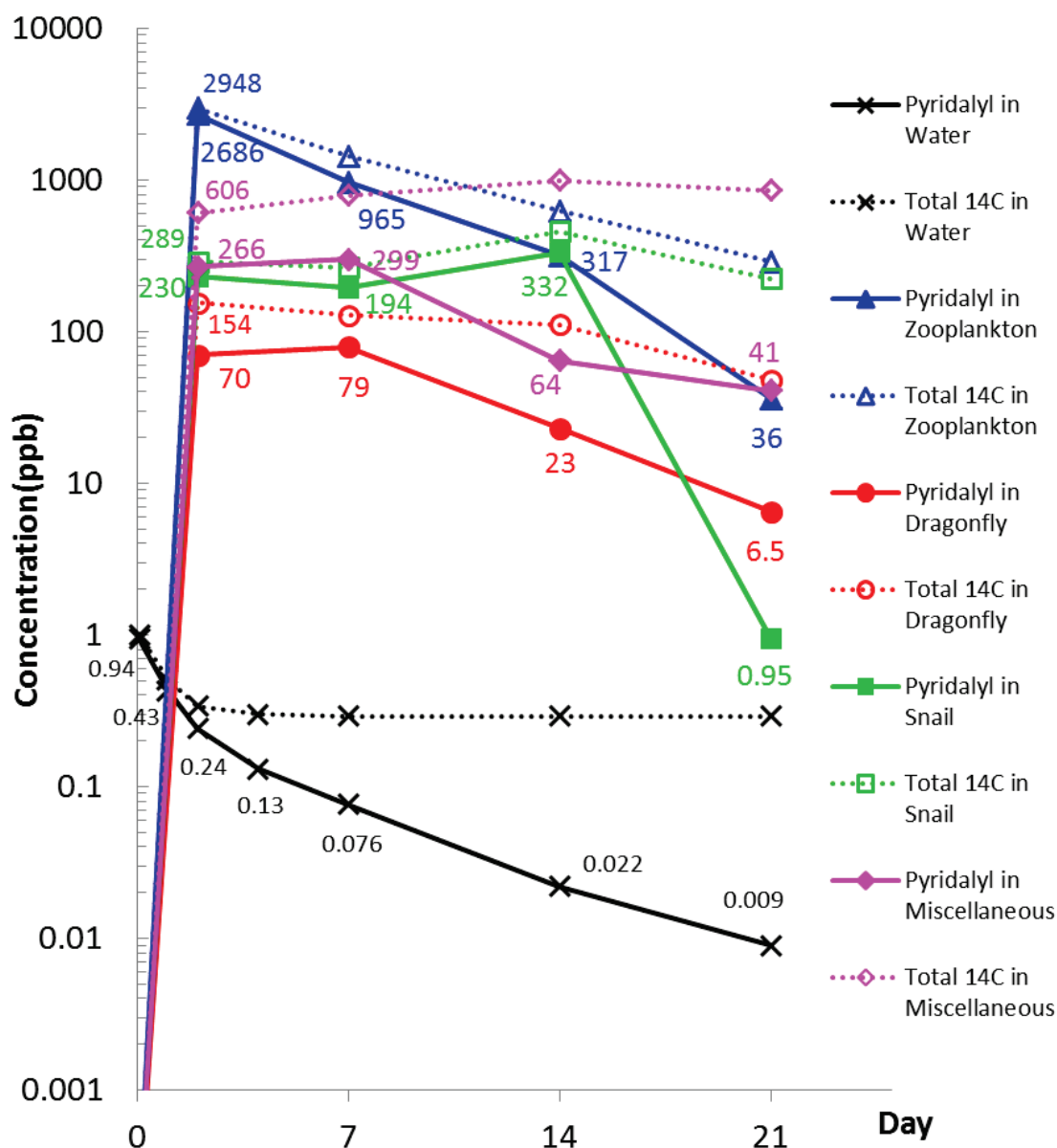


図 15. 野外での水面への ^{14}C ピリダリル処理時の水中、各種生物（動物プランクトン、ヤゴ、貝、雑多種）における全 ^{14}C とピリダリルの濃度推移

2013 年 EFSA 作成・公開の Final addendum to the Draft Assessment Report (EFSA, 2013a) から数値を抽出してグラフ化。

2.3.2. 結果

2.3.2.1. セスジユスリカおよびヨコエビの一種の BCF 推算

毒性値および致死体内濃度から(式 1)により算出されたセスジユスリカおよびヨコエビの一種の BCF 推算値はそれぞれ 72、1200 と推算され(表 9)、ヨコエビにおいてはセスジユスリカに比べ 17 倍高値が得られた。

表 9. セスジユスリカおよびヨコエビの一種の LC₅₀、LBR からの推算 BCF

生物	LC ₅₀	LBR	推算 BCF
セスジユスリカ	1.1 mg/L	79 mg/kg	72
ヨコエビの一種 (対セスジユスリカ比)	0.015 mg/L (0.0014)	18 mg/kg (0.23)	1200 (17)

2.3.2.2. 野外および実験室内におけるピリダリルの各種生物の推定 BCF 値の比較

時間加重平均濃度ならびに各生物サンプリング時点での各生物の BCF_a は表 10 のとおりであり、BCF_a の平均値は動物プランクトン、ヤゴ、貝、雑多混合種でそれぞれ 3100、180、940、690 倍で動物プランクトンが最大、ヤゴが最低であった。BCF_a の最大値でも順位傾向は概ね同様であり、各測定時では動物プランクトンがヤゴの 5.6~37 倍高値でありラボにおいてセスジユスリカとヨコエビの差(17 倍)と近似した。

ラボおよび野外の推算 BCF を生物分類別に比較したところ、生物種や試験・解析条件など様々な違いはあるものの、他の生物分類と比較しても昆虫類と甲殻類でそれぞれラボと野外での値は明確に類似していると考えられた(図 16)。

表 10. 野外マイクロコスムでの各生物サンプルのピリダリル BCFa

			Day 2	Day 7	Day 14	Day 21
時間加重平均水中濃度 (ppb)			0.48	0.23	0.14	0.095
BCFa	動物プランクトン	各測定点	5600	4200	2300	380
		(対ヤゴ比)	(37)	(12)	(14)	(5.6)
	平均値±SD (対ヤゴ比)		3100±2300 (17)			
	ヤゴ	各測定点	150	350	170	68
		平均値±SD		180±120		
	貝	各測定点	480	850	2400	10
		(対ヤゴ比)	(3.3)	(2.5)	(14)	(0.1)
	平均値±SD (対ヤゴ比)		940±1000 (5)			
雑多混合	各測定点	550	1300	470	430	
	(対ヤゴ比)	(1.5)	(8.7)	(2.8)	(6.3)	
平均値±SD (対ヤゴ比)		690±410 (4)				

備考：各生物の BCFa の平均値は Day 2～21 の全測定点の算術平均値。

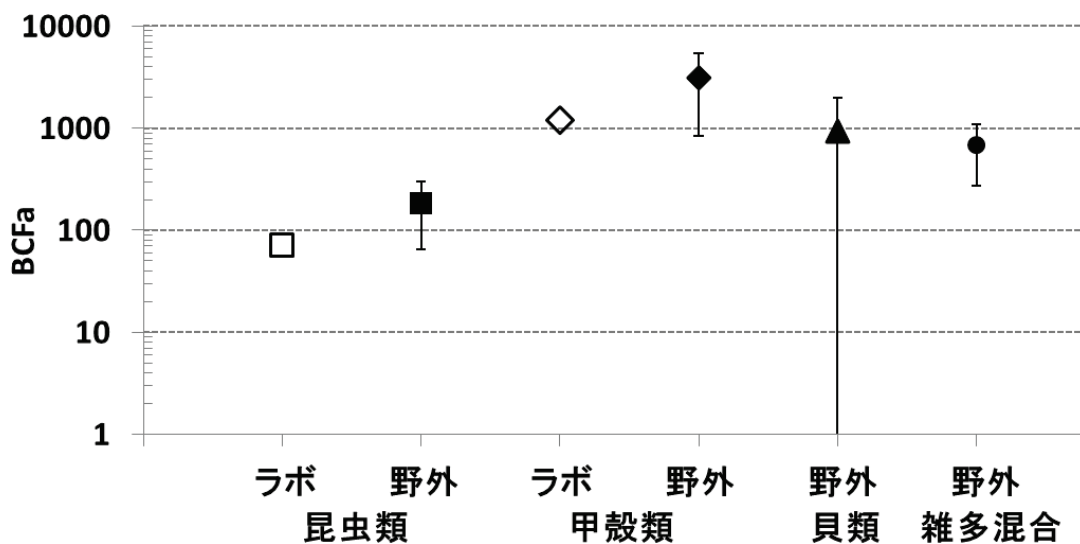


図 16. ピリダリルのラボ、野外での各種生物群の推定 BCF レベルの比較

2.3.3. 考察

毒性値および体内致死濃度から推算した BCF では昆虫セスジユスリカにくらべ代謝能が低く毒性が強かった甲殻類ヨコエビでは約 17 倍高値であった。生物種は異なるものの野外実験において昆虫のヤゴよりも甲殻類のミジンコにおける生物濃縮係数の約 17 倍高値と傾向は良く一致した。一般的に各生物種における BCF においては、生物種毎の生理的特徴に基づく取込み（ヤゴの気管鰓やミジンコ類の鰓状胸脚呼吸など）や代謝・排泄能が大きく関わることから、各種生物群を分類の類似性等から区分することには様々な制約がある。しかしながら、ラボでの標準種昆虫セスジユスリカ、甲殻類ヨコエビ類、野外でのヤゴとミジンコ類サンプルでの BCF と体内全 ^{14}C 中の代謝物を除いたピリダリルの占める割合との関係を見たところ、明らかに正の相関が認められた（図 17）。すなわち、同程度の暴露期間で比較した場合に、体内における代謝分解物の割合が多い種ほど BCF は低値傾向であることが、実験室内での生物試験データのみならず野外データにおいても同様に確認された。このことから BCF へ及ぼす代謝の影響が大きく、各生物種の代謝能が BCF に深く関わることが示唆された。

今回の実験室内標準種における検討や野外天然生物群での残留濃度モニタリング例においても、昆虫と甲殻類における生物濃縮性や代謝能の顕著な違いが示された。このことから、化学物質の総合的生態系への影響評価のための生物濃縮性評価においては、生物多様性に関連し、節足動物類における生物濃縮性評価が重要であることが改めて示唆された。

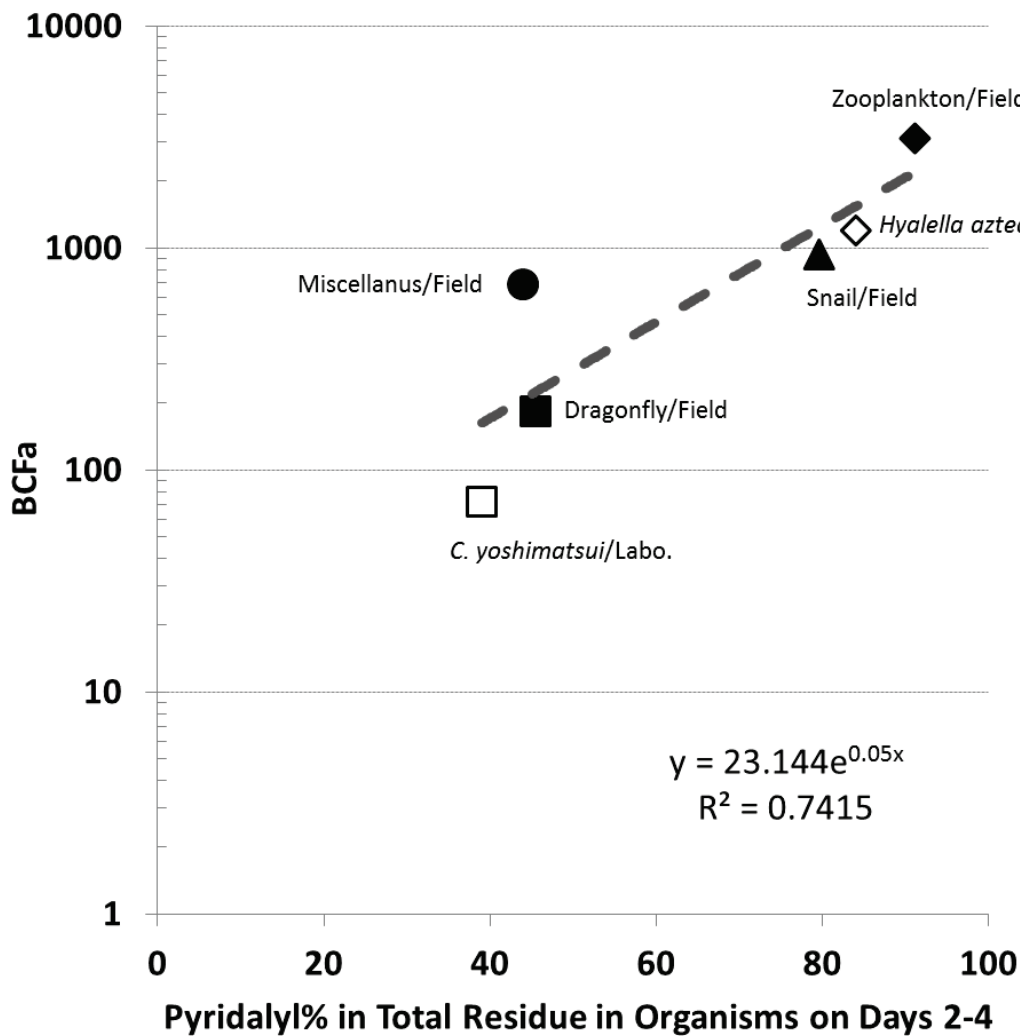


図 17. 生物体内 ^{14}C に占めるピリダリル%と推定 BCF 値の関連性

2.4. 小括

殺虫剤ピリダリルのセスジユスリカ幼虫およびヨコエビの一種成体に対する急性毒性および代謝ならびに体内致死濃度 LBR について ^{14}C 標識化合物を用いて調べた。その結果、平均実測水中濃度に基づく急性 LC_{50} 値はそれぞれ 1.1 mg/L (48 時間), 0.015 (96 時間) mg/L であった。いずれの種においてもピリダリルの主な代謝様式はジクロロアリルオキシ基のエーテル結合の脱アルキル化および抱合化であった。より高い代謝能がセスジユスリカでは認められ、ピリダリルの体内濃度に基づく LBR は両生物種で同レベルであった事から見かけの毒性は主に代謝能に影響されているものと考えられた。このラボでの急性毒性・代謝試験において得られた毒性値 LC_{50} と体内致死濃度

LBR から生物濃縮係数 $BCF=LBR/LC_{50}$ の関係式に基づいて推算されたセスジユスリカおよび *H. azteca* の BCF はそれぞれ 72、1200 であり 17 倍の違いが認められた。他方、既存のピリダリル野外池試験における水中および各種水生生物中のピリダリル濃度推移データから推算された BCF のうち、水生昆虫のヤゴ、甲殻類のミジンコの値はそれぞれ 180 ± 120 、 3100 ± 2300 であり、ラボでの毒性試験データからの昆虫類（セスジユスリカ）と甲殻類（ヨコエビの一種）での推算値は野外の近縁分類群（昆虫：ヤゴ、甲殻類：ミジンコ類）の値と近似した。このことから、生物間の比較などにおいて毒性値と体内致死濃度からの BCF 推算の活用性が示唆された。また、ラボ標準種、野外生物の何れにおいても BCF の低い生物群では代謝物量の割合が高く、各種無脊椎動物においても代謝が BCF に及ぼす影響の大きいことが示唆された。

第3章 一次代謝物に着目した速度論的解析や *in vitro* 試験活用の類縁体 BCF 簡易評

価手法の検討

—魚類における *in vivo* および *in vitro* の濃縮性/代謝試験によるピレスロイド系殺虫剤テトラメトリンのトランスおよびシス異性体の生物濃縮性の検討—

3.1. 緒言

テトラメトリン(ネオピナミン®、3,4,5,6-tetrahydrophthalimidomethyl(1*RS*)-*cis, trans*-chrysanthemate、分配係数 LogKow=4.6)は優れたノックダウン活性を有する合成ピレスロイド系殺虫剤の1つであり4つの異性体から構成される(図18)。すなわち、キク酸のシクロプロパン環の2つの不斉炭素の組み合わせによる4異性体、1*R*トランス、1*S*トランス、1*R*シス、1*S*シスが存在し、その異性体組成比は4:4:1:1であり、1*R*トランス異性体が最も生物活性が高い(Kato *et al.*, 1964; WHO, 1990; US EPA, 2010)。

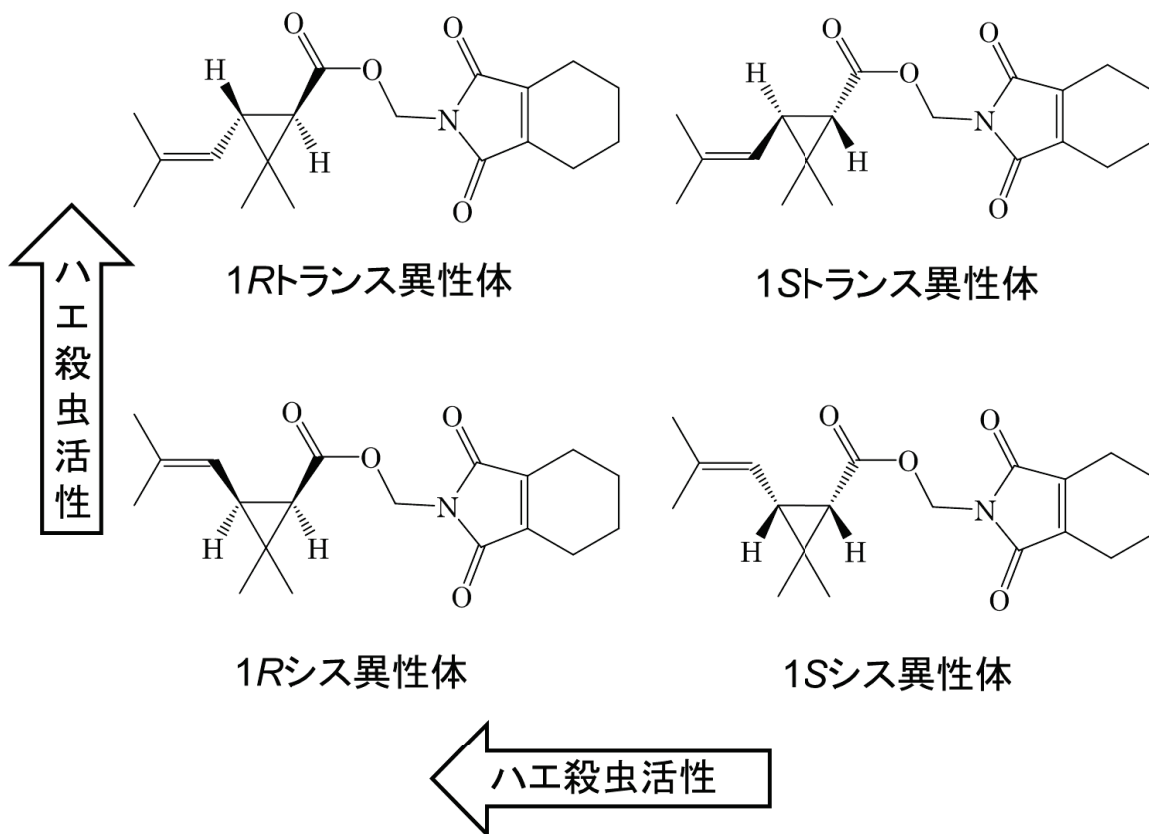


図18. テトラメトリン各異性体の立体構造と殺虫活性

テトラメトリンの典型的な使用法は屋内、住宅地あるいは公衆衛生目的の限定的な屋外用途であり、自然水系への混入は顕著ではないと考えられる。更に、たとえ水系に混入したとしてもテトラメトリンの高い加水分解性(Katagi, 1993)から長期残留はし難いと考えられ、水生生物への生物濃縮性や汚染の懸念は極めて低いと考えられる。しかしながら、より精緻・定量的なテトラメトリンの水系環境における影響評価には、更に詳細な環境運命、生態毒性データの収集・蓄積が有用である。特に魚類などピレスロイド感受性生物群(Maund *et al.*, 2012)を用いた生物濃縮性や代謝挙動の評価・解明は重要な1項目と考えられる。

一方で、これまでの様々な哺乳動物におけるテトラメトリン代謝研究において、その主要代謝様式はエステルやイミド結合の開裂とキク酸の酸化、アルコール側部位の還元や水酸化、更にはグルクロン酸や硫酸抱合化が知られている(Miyamoto *et al.*, 1968; Kaneko *et al.*, 1981, 1984; Smith *et al.*, 1981; Suzuki *et al.*, 1974; Silver *et al.*, 1989, 1989a; Tomigahara *et al.*, 1994, 1994a)。これら知見を踏まえると、テトラメトリンはピレスロイドの魚濃縮・代謝研究題材の適切な化合物の1つである。実験1で先ず、テトラメトリンのトランス異性体¹⁴C標識体を用いた *in vivo* 濃縮・代謝試験を行い BCF や代謝・排泄挙動を明らかにし、実験2において魚ホモジネートを用いたシス、トランス異性体の *in vitro* 代謝速度評価試験を行い、実験1で得られた速度論的パラメータを用いて、テトラメトリンのマイナー成分であるシス異性体の BCF の推算を行った。

3.2. 実験

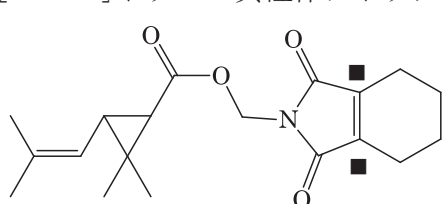
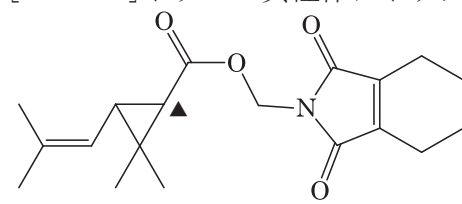
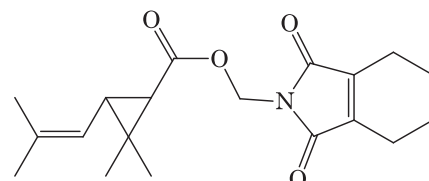
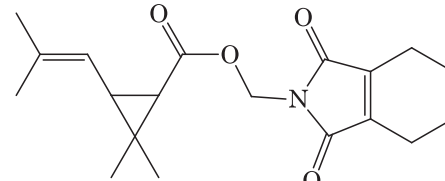
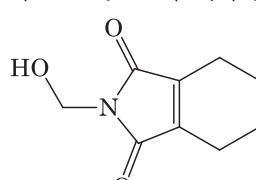
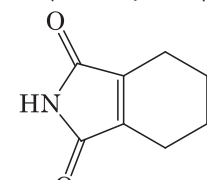
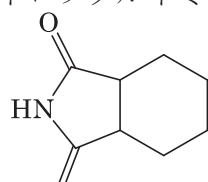
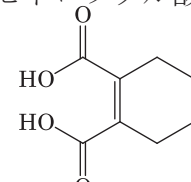
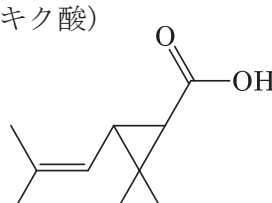
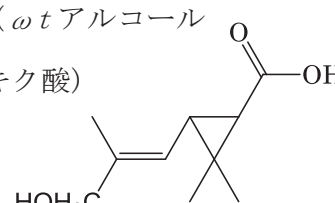
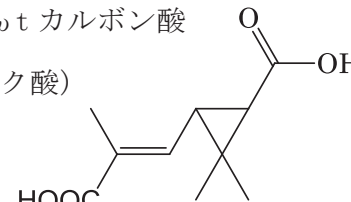
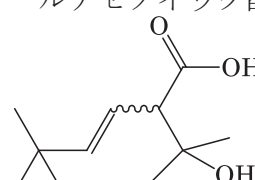
実験1 トランス異性体テトラメトリンのブルーギルにおける濃縮、代謝、排泄挙動

3.2.1.1. 材料と方法

3.2.1.1.1. 被験物質、標品、その他試薬

2種類の¹⁴C標識化した放射化学的純度>98%のトランス異性体テトラメトリンを被験物質として用いた。すなわち、エステル構造のアルコール側部位3,4,5,6テトラヒドロフタルイミド環の1および2位の炭素を¹⁴C標識化した[Alc-¹⁴C] (比放射能 1.83 GBq/mmol)およびエステル構造の酸側、キク酸のシクロプロパン環の1位の炭素を¹⁴C標識化した[Acid-¹⁴C] (比放射能 1.62 GBq/mmol)を用いた (表11)。

表 11. 使用した ^{14}C 標識化被験物質および代謝物標品

化合物、略称	化合物、略称
<p>[Alc-^{14}C]トランス異性体テトラメトリン</p>  <p>■: ^{14}C 標識位置</p>	<p>[Acid-^{14}C]トランス異性体テトラメトリン</p>  <p>▲: ^{14}C 標識位置</p>
<p>トランステトラメトリン</p> 	<p>システトラメトリン</p> 
<p>TPIA(テトラヒドロフタルイミドメチルアルコール)</p> 	<p>THPI(テトラヒドロフタルイミド)</p> 
<p>HPI(ヘキサヒドロフタルイミド)</p> 	<p>THPA(テトラヒドロフタル酸)</p> 
<p>CRA(トランスキク酸)</p> 	<p>CH_2OH-CRA(ωtアルコールトランスキク酸)</p> 
<p>COOH-CRA(ωtカルボン酸トランスキク酸)</p> 	<p>Diol-DA(ジオールデセノイック酸)</p> 

加えて、代謝物同定用標準物質として非 ^{14}C 標識のテトラメトリン両異性体および酸

側、アルコール側の各種代謝物標品（いずれも純度 85.6%以上、住友化学製）を用いた（表 11）。

β -グルクロニダーゼ (type VII-A)、サルファターゼ (type H-1)、*d*-サッカリン酸 1,4-ラク톤はシグマ社製を使用し、その他の試薬も市販品を用いた。

3.2.1.1.2. 供試生物

供試魚のブルーギル稚魚は、南郷水産センター（滋賀県）から入手し 8 ヶ月間馴化飼育後に供試した。馴化中は脱塩素水（上水を活性炭で脱塩素した水）を用い、16 時間/日の蛍光灯照明下で毎日市販飼料（日清製粉製）を魚体重約 1%量給餌した。暴露開始時の馴化個体群の平均体重、標準体長はそれぞれ 1.9 ± 0.2 g、 4.1 ± 0.1 cm であり、脂肪含有率 (Folch *et al.*, 1957; Bligh *et al.*, 1959) は平均 3.7%であった。

3.2.1.1.3. 生物暴露試験

ブルーギルの暴露、排泄試験は OECD ガイドラインに準じた連続流水系の試験条件下（試験温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、16 時間照明/日、pH 6.5-7.9、DO 6.6-7.7ppm）で行い、設定暴露濃度は 1 $\mu\text{g/L}$ (ppb) とした。DMF (*N,N*-ジメチルホルムアミド) を溶解助剤として被験物質ストック液を調製し、ストック液と脱塩素水を一定流量 (夏目製作所製 自動注入装置、Fluid Metering Inc. 製 FMI ラボポンプ) で混合して試験水を調製し、[Alc- ^{14}C] および [Acid- ^{14}C] の 2 暴露区に加えて助剤のみを含む対照区 (10 ppm) を設置した。試験容器として 40 L 容ガラス水槽 (40×40×40 cm) を用い、試験区あたり 85 尾供試した。試験液は 15 回換水/日の流量で供給し、28 日間暴露し定期的に水および魚をサンプリングし被験物質、代謝物を分析した。暴露期間終了後に暴露水槽中の供試魚を 20L 容ガラス水槽 (30×30×30 cm) に移し、引き続き 14 日間の排泄試験を行った。

被験物質や代謝物の分析は、化学分析、放射能分析により行い、代謝物同定は薄層クロマトグラフィー (TLC) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) での標品とのコクロマトグラフィーにより行った。抱合体においては TLC での単離分取後、LC-APCI-MS 分析による分子量特定や加水分解による抱合体アグリコン遊離後のコクロマトグラフィーにより同定を行った。抱合体加水分解は β グルクロニダーゼ (0.1M の pH6.8 リン

酸バッファー中 10 mg/mL、37°C 終夜培養) あるいはサルファターゼ (0.1M の pH5 酢酸ナトリウムバッファー中 20 mg/mL、混在グルクロニダーゼ阻害に *d* サッカリン酸 1,4 ラクトン添加、37°C 終夜培養) の酵素加水分解あるいはアルカリ加水分解 (3M 水酸化ナトリウム水溶液中 110°C で約 18 時間還流) により行った。

3.2.1.1.4. 放射能分析ならびに化学分析およびスペクトル分析

暴露水サンプルあるいはその有機溶媒抽出物や抽出残渣サンプル、供試魚サンプルの有機溶媒抽出物、更には各種 TLC 分析サンプルの TLC プレート上の成分スポット部分を掻き取ったシリカゲルサンプルの放射能 (^{14}C) の定量には液体シンチレーションカウンター (LSC、パッカー製、460 型あるいは 4640 型) を使用し、LSC 用カクテルとして Emulsifier-Scintillator 299™ を用いた。魚サンプルのホモジネートや未抽出残渣サンプルはサンプルオキシダイザー (パッカー社製、306 型) により燃焼し $^{14}\text{CO}_2$ をトラップ剤 Carbosorb® (パッカー) で捕集 (^{14}C 回収率 $\geq 95\%$) し LSC 測定に供した。

暴露水、魚中の各 ^{14}C 成分 (被験物質、代謝物) の分析は TLC および HPLC により行い、TLC 分析はシリカゲル TLC (メルク製、Silica gel 60F₂₅₄ chromatoplate、20 x 20 cm、0.25 mm) を用い 2 次元あるいは 1 次元の分析により行い、HPLC は日立製システム (L-6200 型ポンプ、L-4000 型 UV モニター (230 または 215nm 検出)) と ODS カラム (Sumipax A-212、5 μm 、6 mmID x 15 cm) を用いた逆相グラジエント分析により行った。各クロマトグラフィーでの ^{14}C 成分スポットあるいはピークの検出は、TLC 分析では X-ray SB フィルム (コダック製) への接着露光、HPLC 分析では流路に接続した RI 検出器 (パッカー製、FLO-ONE/Beta A-120 型、500 μL 液体セル、PICO-AQUA™ シンチレーター使用) で行った。また、試験水中および魚体中でのトランステトラメトリンの 1*R*、1*S* 異性体比を確認するため、代表的サンプルについて光学分割 HPLC 分析 (2 連の SUMICHIRAL OA-2000 (5 μm 、4 mmID x 25 cm) カラム連結) を行った。

TLC、HPLC 条件および各代謝物の保持係数 (R_f)、あるいは保持時間 (t_R) を表 12 に示す。

表 12. TLC、HPLC 条件および各代謝物の R_f 値、保持時間 (t_R)

		TLC R _f 値				HPLC t _R (分)	
		A	B	C	D	グラジエント	光学分割
トランステトラメトリン		0.48	0.61	0.60	-	60.2	1 <i>R</i> 体 45.0 1 <i>S</i> 体 47.0
システトラメトリン		0.47	0.60	0.60	-	59.6	-
TPIA		-	0.43	0.18	-	22.7	-
THPI		-	0.50	0.31	-	23.7	-
HPI		-	0.46	0.26	-	16.7	-
THPA		-	0.38	0.14	-	17.2	-
CRA	フリー体	0.56	0.46	-	-	43.4	-
	タウリン抱合体	-	-	-	0.44	28.1	-
CH ₂ OH- CRA	フリー体	0.23	0.46	-	-	22.9	-
	グルクロン酸抱合体	-	-	-	0.34	35.3	-
COOH- CRA	フリー体	0.31	0.48	-	-	26.9	-
	タウリン抱合体	-	-	-	0.39	11.4	-
	アミノ酸抱合体	-	-	-	0.37	-	-
Diol-DA		0.08	0.27	-	-	10.1	-
<p>分析条件</p> <p>TLC 展開溶媒 : A) ヘキサン/酢酸エチル/酢酸(10/4/1, v/v/v)</p> <p>B) トルエン/ギ酸エチル/ギ酸(5/7/1, v/v/v)</p> <p>C) ヘキサン/トルエン/酢酸(3/15/2, v/v/v, 2 回展開)</p> <p>D) ブタノール/酢酸/水(6/1/1, v/v/v)</p> <p>HPLC グラジエント条件 : 直線グラジエント、溶媒 A(アセトニトリル)/B(0.05%トリフルオロ酢酸水)=10/90(0分) - 50/50(30分) - 100/0(60分) - 100/0(75分)、 流速 1 mL/分</p> <p>HPLC 光学分割条件 : アイソクラティック、溶媒 n-ヘキサン/エタノール =400/1(v/v)、流速 1 mL/分</p>							

3.2.1.1.5. 速度論的解析

暴露、排泄試験のトランステトラメトリン魚体中濃度の速度論的解析は OECD の魚濃縮性試験ガイドライン 305 (OECD, 2012) の速度式に準じた。すなわち以下の微分方程式をもとに行い、OECD ガイドラインにおいては鰓および糞/尿それぞれに細分化された排泄速度はパラメータ取扱いの実務性から総和の排泄速度とし、生長速度については適切にバイオマスをコントロールした試験条件下では殆ど無視できるレベルである (例えば 28 日間の体重変化が±50%であれば速度定数は<0.01 /day) ことからここでは省略した。

$$dC_f(t)/dt = k_u \times C_w(t) - (k_e + k_m) \times C_f(t) \quad (\text{式 2})$$

$C_f(t)$: トランステトラメトリン魚体中濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

$C_w(t)$: トランステトラメトリン暴露水中濃度 ($\mu\text{g}/\text{L}$)

k_u : 魚のトランステトラメトリン取り込み速度定数 ($\text{L}/\text{kg}/\text{day}$)

$k_e + k_m$: 魚体中トランステトラメトリン消失速度定数 ($/\text{day}$)

排泄速度定数 (k_e) と代謝速度定数 (k_m) の和

上記(式 2)は暴露期間、排泄期間それぞれ以下の如く展開でき、この関数式および実験値を用い、カーブフィッティングプログラム (SigmaPlot, Version 10.0, SPSS Inc. あるいは CAKE, Version 2.0, Tessella) により解析した。

$$\text{排泄期間 : } C_f(t) = C_f(0) \times \exp\{- (k_e + k_m) \times t\}$$

$$T_{1/2} = \ln(2) / (k_e + k_m)$$

$$\text{暴露期間 : } C_f(t) = C_w(t) \times (k_u / (k_e + k_m)) \times [1 - \exp\{- (k_e + k_m) \times t\}]$$

$$C_f(t) / C_w(t) = (k_u / (k_e + k_m)) \times [1 - \exp\{- (k_e + k_m) \times t\}]$$

$$\text{BCF}_{ss} = C_f(t) / C_w(t) \quad \langle \text{平衡状態 BCF 値} \rangle$$

$$\text{BCF}_k = k_u / (k_e + k_m) \quad \langle \text{速度論的 BCF 値} \rangle$$

更に、トランステトラメトリンの魚体内における代謝分解速度 k_m の解析を上記の(式 2)を応用して一次代謝物に着目した以下の微分方程式および図 19 のコンパートメン

トモデルから行った。

$$dC_{mf}(t)/dt = k_m \times C_f(t) - (k_{me} + k_{mm}) \times C_{mf}(t) \quad (\text{式 3})$$

$C_{mf}(t)$: 一次代謝物の魚体中濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

$k_{me} + k_{mm}$: 魚体中一次代謝物の消失速度定数 (/day)

排泄速度定数 (k_{me}) と代謝速度定数 (k_{mm}) の和

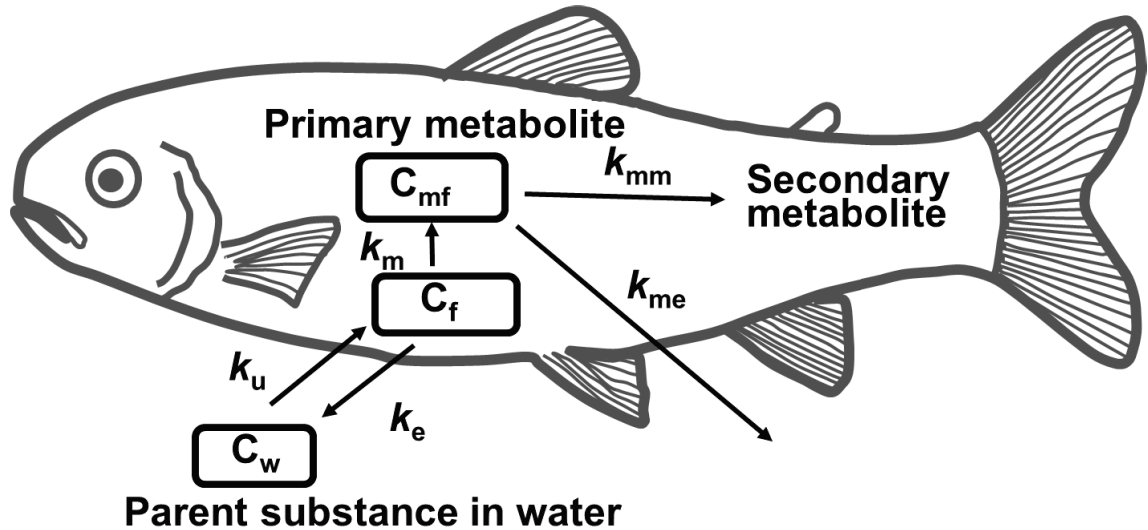
すなわち、被験物質の暴露水と魚体での取込みと排泄・代謝の平衡と同様に魚体内の一次代謝物は被験物質の濃縮平衡時には魚体内の一次代謝物の生成速度と排泄・代謝の平衡にあると仮定できる。上記の(式 3)の平衡時の特殊解($dC_{mf}(t)/dt=0$)から k_m は以下の(式 4)で示され、これに濃縮平衡時の魚体中のトランステトラメトリンと一次代謝物の濃度比率 C_{mf}/C_f からトランステトラメトリンの代謝速度定数 k_m を算出した。

$$k_m \times C_f - (k_{me} + k_{mm}) \times C_{mf} = 0$$

$$k_m \times C_f = (k_{mm} + k_{me}) \times C_{mf}$$

$$k_m = (k_{mm} + k_{me}) \times C_{mf} / C_f \quad (\text{式 4})$$

更に、消失速度定数 ($k_{me} + k_{mm}$) は排泄期間中の C_f および C_{mf} の実験値を用いたカーブフィッティングによって解析した。



[Kinetics of Parent substance and Primary metabolite in fish]

Parent substance: $dC_f(t)/dt = k_u \cdot C_w(t) - (k_e + k_m) \cdot C_f(t)$

Exposure phase: $C_f = C_w \cdot (k_u / (k_e + k_m)) \cdot [1 - \exp\{-(k_e + k_m) \cdot t\}]$

At plateau: $BCF = C_f / C_w = (k_u / (k_e + k_m))$

Primary metabolite: $dC_{mf}(t)/dt = k_m \cdot C_f(t) - (k_{me} + k_{mm}) \cdot C_{mf}(t)$

At plateau in Exposure phase: $C_{mf} / C_f = k_m / (k_{me} + k_{mm})$

図 19. 魚における被験物質の取込みと一次代謝物への代謝分解および排泄のコンパートメントモデル

C_w : 水中の被験物質濃度、 C_f : 魚体中の被験物質濃度、 C_{mf} : 魚体中の被験物質一次代謝物濃度、 k_u : 魚における被験物質取込み速度定数、 k_e : 魚における被験物質排泄速度定数、 k_m : 魚における被験物質代謝速度定数、 k_{me} : 魚における被験物質一次代謝物の排泄速度定数、 k_{mm} : 魚における被験物質一次代謝物の更なる代謝速度定数。

3.2.1.2. 結果

3.2.1.2.1. 濃縮・排泄挙動

暴露期間中、水中の被験物質濃度は何れのラベル試験区においても安定で、全 ^{14}C 濃度で設定の 93-110%の範囲であり、トランステトラメトリンとして平均水中濃度 (0.67 $\mu\text{g/L}$) の 80-120%を維持した (表 13、14 ; 図 20)。

暴露期間中、供試魚に異常、毒性症状は見られず、サンプリングした供試魚の平均体重も安定的に維持された (暴露開始時の約 120%以内)。供試魚中のトランステトラメトリン濃度は暴露開始後速やかに上昇し、2 週後には 120-210 ppb で平衡に達し (表 13、14 ; 図 20)、 BCF_{ss} (steady-state BCF) は $[\text{Alc-}^{14}\text{C}]$ 、 $[\text{Acid-}^{14}\text{C}]$ 暴露区でそれぞれ 210-300、180-310 であり、全体として 180-310 であった。

排泄期間において、魚体中のトランステトラメトリンの 95%以上が 7 日以内に速やかに消失し、その半減期は 0.54 - 0.72 日 ($k_{\text{m}}+k_{\text{e}}=0.96-1.2$ /day、 $r^2=0.99-1.0$) であった。また、カーブフィッティングによる取込み速度定数 (k_{i}) 推算値は 170-210 /day と算出されたものの相関係数が低く ($r^2=0.014-0.033$)、暴露初期のサンプリング間隔の制約等によるものと推察された。

表 13. [A1c-¹⁴C]試験区の水中、魚体中の被験物質および代謝物各成分の割合、濃度

	濃度, ppb (TRR%) [§]													
	暴露期間							排泄期間						
	Day 0	Day 3	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 1	Day 3	Day 7	Day 10	Day 14			
水分析														
全 ¹⁴ C (TRR)	0.969	1.07	1.01	1.08	0.983	0.959	-	-	-	-	-	-	-	-
トランステトラメトリン	0.766	0.659	0.693	0.549	0.669	0.670	-	-	-	-	-	-	-	-
	(79.0)	(61.6)	(68.6)	(50.8)	(68.1)	(69.9)	-	-	-	-	-	-	-	-
その他	(21.0)	(38.4)	(31.4)	(49.2)	(31.9)	(30.1)	-	-	-	-	-	-	-	-
魚分析														
全 ¹⁴ C (TRR)	-	142	242	624	584	606	383	204	139	122	94.6			
未抽出画分	-	(19.2)	(17.9)	(24.5)	(26.8)	(32.0)	(36.1)	(53.7)	(67.9)	(69.5)	(69.2)			
抽出画分	-	(80.8)	(82.1)	(75.5)	(73.2)	(68.0)	(63.9)	(46.3)	(32.1)	(30.5)	(30.8)			
トランステトラメトリン	-	13.5	14.3	200.3	139.6	154.5	60.1	6.7	1.3	ND	-			
	-	(9.5)	(5.9)	(32.1)	(23.9)	(25.5)	(15.7)	(3.3)	(0.9)	ND	-			
THPI	-	(13.1)	(10.0)	(1.4)	(1.4)	(2.3)	(1.2)	(1.0)	(0.2)	(0.3)	-			
HPI	-	(13.0)	(8.5)	(2.3)	(2.0)	(2.4)	(1.7)	ND	(0.4)	ND	-			
THPA	-	(2.6)	(2.1)	(0.5)	(0.9)	(1.2)	(0.8)	ND	ND	ND	-			
その他	-	(42.6)	(55.6)	(39.2)	(45.0)	(36.6)	(44.5)	(42.0)	(30.6)	(30.2)	-			

§ : サンプル (水あるいは魚) 中の全¹⁴Cに対する各成分の%値。

- : Not applicable.

ND: Not detected.

表 14. [Acid-¹⁴C]試験区の水中、魚体中の被験物質および代謝物各成分の割合、濃度

	濃度, ppb (TRR%) [§]													
	暴露期間							排泄期間						
	Day 0	Day 3	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 1	Day 3	Day 7	Day 10	Day 14			
水分析														
全 ¹⁴ C (TRR)	0.925	1.06	1.08	1.10	0.984	1.00	-	-	-	-	-	-	-	-
トラスステトラメトリン	0.792 (85.6)	0.536 (50.6)	0.679 (62.9)	0.711 (64.6)	0.622 (63.2)	0.695 (69.5)	-	-	-	-	-	-	-	-
その他	(14.4)	(49.4)	(37.1)	(35.4)	(36.8)	(30.5)	-	-	-	-	-	-	-	-
魚分析														
全 ¹⁴ C (TRR)	-	448 (9.8)	398 (8.0)	644 (14.8)	378 (16.7)	585 (10.9)	293 (12.9)	90.9 (36.4)	54.5 (63.6)	39.0 (71.2)	28.4 (65.7)			
未抽出画分	-	(90.2)	(92.0)	(85.2)	(83.3)	(89.1)	(87.1)	(63.6)	(36.4)	(28.8)	(34.3)			
抽出画分														
トラスステトラメトリン	-	11.2 (2.5)	16.7 (4.2)	209.0 (32.4)	118.0 (31.2)	191.0 (32.7)	50.7 (17.3)	14.0 (5.2)	2.8 (5.2)	-	-			
CRA	-	(20.1)	(21.7)	(5.1)	(5.2)	(8.0)	(5.1)	ND	ND	-	-			
CRAタウリン抱合体	-	(9.4)	(7.2)	(3.9)	(2.6)	(4.0)	(3.5)	(1.8)	ND	-	-			
CH20H-CRA*	-	(3.8)	(7.9)	(3.2)	(3.6)	(5.5)	(8.2)	(5.4)	(1.2)	-	-			
CH20H-CRA グルクロン酸抱合体	-	(1.7)	(4.5)	(4.5)	(1.9)	(3.6)	(3.3)	(1.8)	ND	-	-			
C00H-CRA	-	(4.1)	(8.4)	(3.2)	(3.2)	(3.3)	(7.1)	(1.7)	(1.4)	-	-			
C00H-CRAタウリン抱合体	-	(7.7)	(15.6)	(6.5)	(6.5)	(5.2)	(11.1)	(3.7)	ND	-	-			
C00H-CRA抱合体#	-	(6.0)	(10.8)	(5.9)	(3.9)	(4.9)	(7.5)	(2.5)	ND	-	-			
Diol-DA	-	(0.5)	(1.1)	(6.2)	(7.7)	(5.6)	(8.2)	(5.4)	(1.2)	-	-			
Others	-	(34.4)	(10.6)	(14.3)	(17.5)	(16.3)	(15.8)	(25.9)	(27.4)	-	-			

§: サンブル (水あるいは魚) 中の全¹⁴Cに対する各成分の%値。*: 2次元TLCにおいてシングルスポットとして検出、HPLCではCH20H-CRAに加えて1ピーク検出 (ピーク比2:3)。#: アミノ酸抱合体と推測。

-: Not applicable.

ND: Not detected.

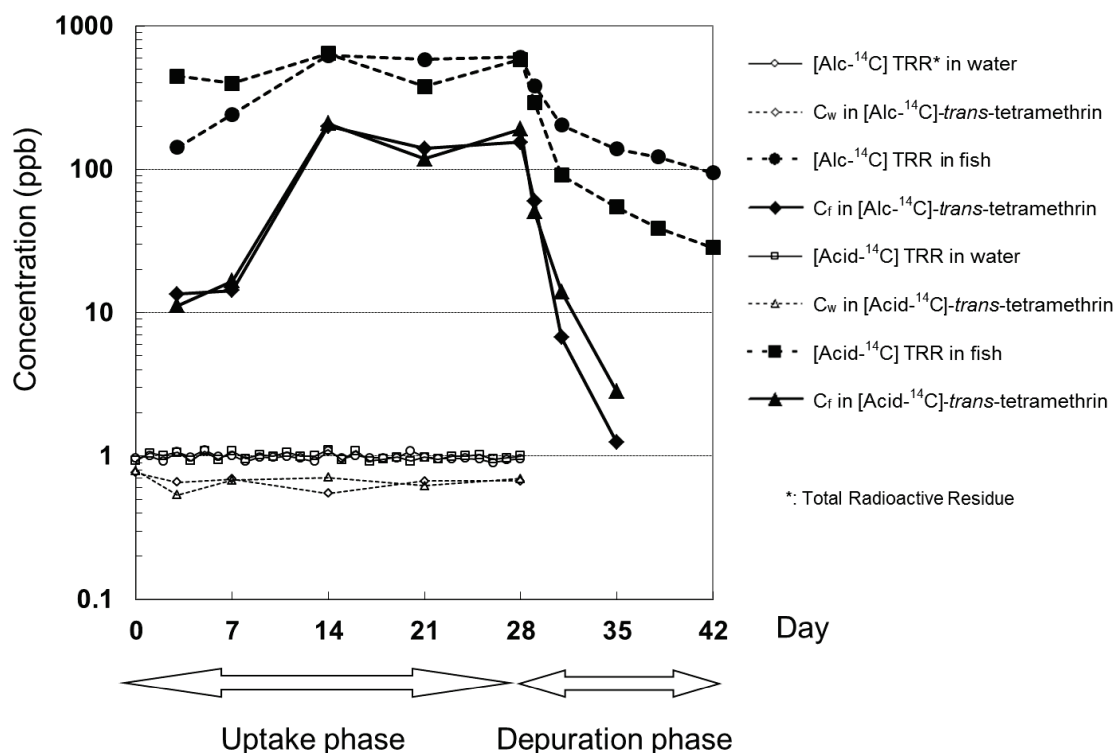


図 20. 全 ^{14}C およびトランステトラメトリンのブルーギル *Lepomis macrochirus* における濃縮・排泄挙動

- ◇(実線) : [Alc- ^{14}C]水中全 ^{14}C 濃度、◇(破線) : [Alc- ^{14}C]水中トランステトラメトリン濃度、●(破線) : [Alc- ^{14}C]魚体中全 ^{14}C 濃度、◆(実線) : [Alc- ^{14}C]魚体中トランステトラメトリン濃度；
- (実線) : [Acid- ^{14}C]水中全 ^{14}C 濃度、△(破線) : [Acid- ^{14}C]水中トランステトラメトリン濃度、■(破線) : [Acid- ^{14}C]魚体中全 ^{14}C 濃度、▲(実線) : [Acid- ^{14}C]魚体中トランステトラメトリン濃度

3.2.1.2.2. 代謝様式

水中および魚体中とも代表的サンプルにおいてトランステトラメトリンの 1*R*、1*S* の異性体比はほぼ 1:1 であり顕著な変化は認められなかった。

魚体中において [Alc- ^{14}C]、[Acid- ^{14}C] の両暴露区で共通する代謝物は認められず、エステル開裂が第一段階の代謝経路であった。

[Alc- ^{14}C] 試験区では THPI、HPI、THPA が最大 2.6~13.1% 検出された (表 13)。エステル開裂分解物である TPIA は検出されず、速やかに THPI に代謝分解され、更に HPI

や THPA へと代謝が進むものと推察された。

[Acid- ^{14}C]試験区ではエステル開裂分解物である CRA とそのイソブテニル末端メチル基が酸化された分解物 CH₂OH-CRA、COOH-CRA に加えて CRA のエポキシ体を中間体として経由しシクロプロパン環が酸化的に開環した Diol-DA が最大 7.7~21.7%検出された (表 14)。加えて、CRA や COOH-CRA のタウリン抱合体、CH₂OH-CRA のグルクロン酸抱合体、COOH-CRA 抱合体が最大 4.5~15.6%検出された。

CRA や COOH-CRA のタウリン抱合体の同定はアルカリ加水分解によるアグリコン部の遊離と LC-MS 分析による分子量特定 (それぞれ m/z 276、306) により行った。また、CH₂OH-CRA のグルクロン酸抱合体の同定は酵素 (β -グルクロニダーゼ) 加水分解により行った。更に、COOH-CRA 抱合体は酵素加水分解 (β -グルクロニダーゼならびにサルファターゼ) では変化は認められなかったものの、アルカリ加水分解により COOH-CRA が遊離した。この抱合体については、採集できた代謝物量の制約等から追加機器分析は出来なかったものの、一般に水生生物で知られる抱合体様式 (Lech *et al.*, 1985, Miyamoto *et al.*, 1990 ; Katagi, 2010 ; Tierney *et al.*, 2014) からアミノ酸抱合体と推測された。

同定された代謝物から推定されたトランステトラメトリンのブルーギルにおける代謝経路を図 21 に示す。

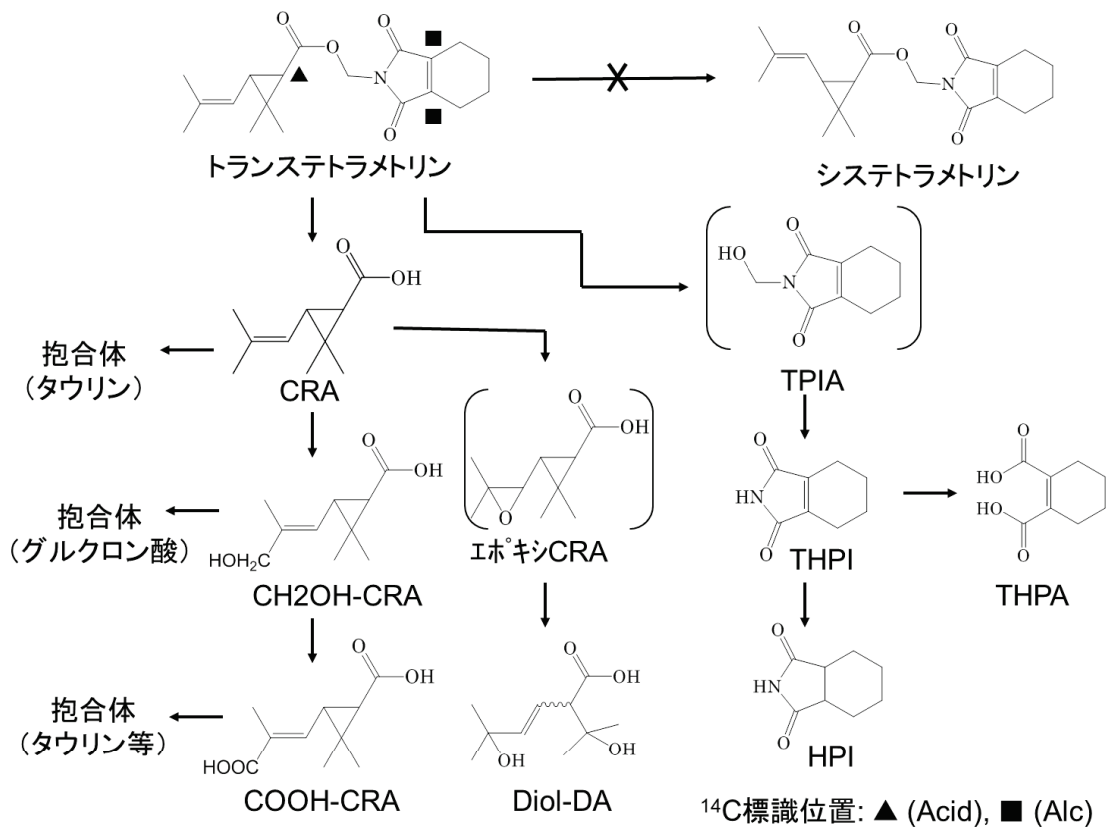


図 21. トランステトラメトリンのブルーギルにおける推定代謝経路

3. 2. 1. 2. 3. 代謝速度の推算

トランステトラメトリンのブルーギルにおける一次代謝物はアルコール側では THPI、酸側では CRA であり、濃縮平衡時 (14-28 日) の C_{mf}/C_f はそれぞれ 0.064、0.19 と算出された。しかしながら、CRA については、排泄期間におけるデータが 1 点のみに限られカーブフィッティングに制約があることから、代謝速度推算のための解析は THPI のみで行った。排泄期間のデータを用いたカーブフィッティング解析の結果、THPI の消失速度定数 ($k_{mm} + k_{me}$) は 6.3 /day ($\chi^2=13.5\%$) と算出された (図 22)。

得られたこれらの値と上記(式 3)から、代謝速度 k_m は 0.41 /day (6.3×0.064) と算出され、消失速度との差から排泄速度 k_e は 0.55 /day ($0.96 - 0.41$) と見積もられた。

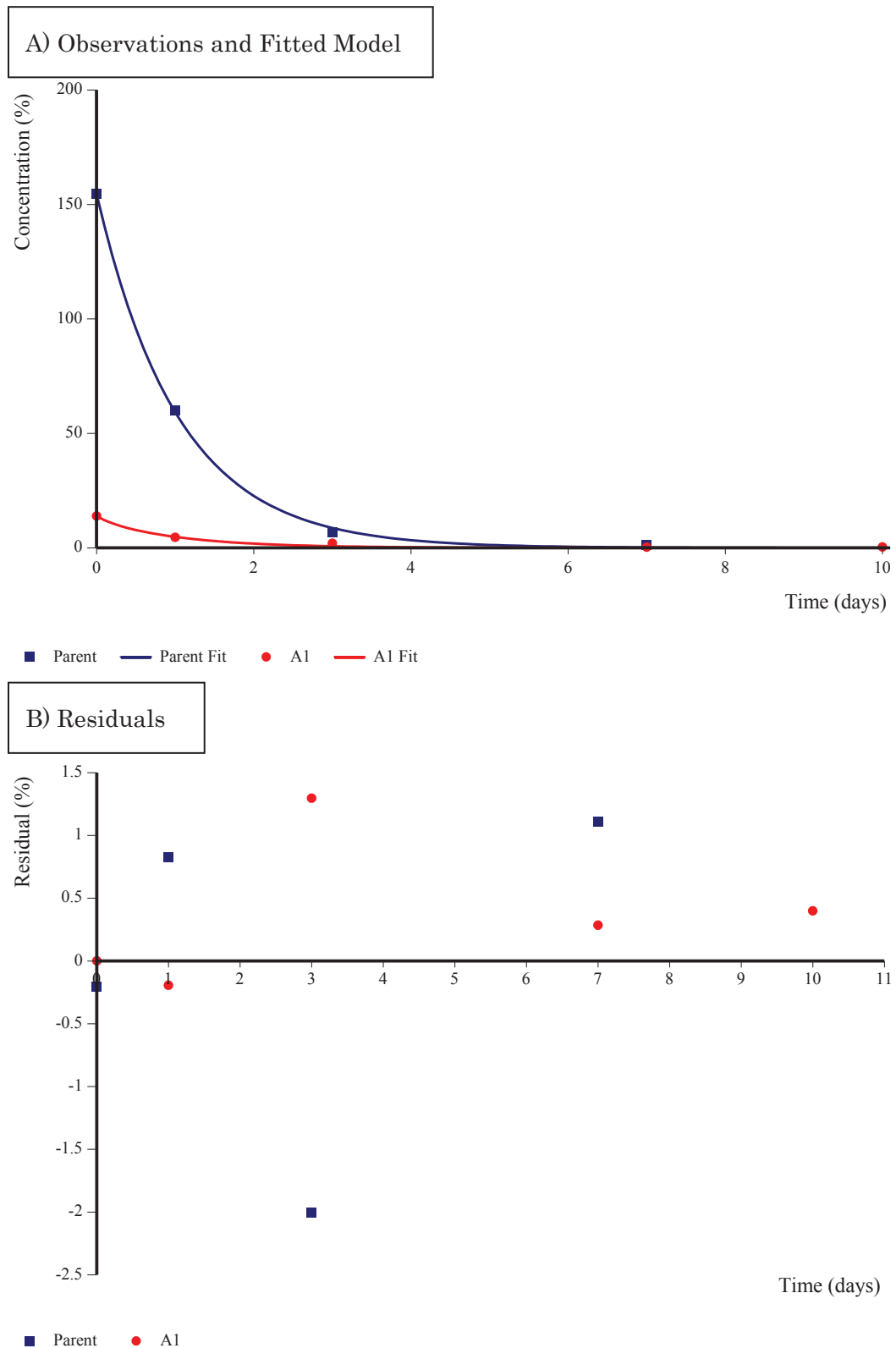


図 22. トランステトラメトリンおよび代謝物 THPI のブルーギルでの濃縮・代謝試験の排泄期間におけるカーブフィッティング

Parent: トランステトラメトリン、A1 : THPI

実験2 テトラメトリン幾何異性体シス、トランス体のコイホモジネートにおける *in vitro* 分解速度とシステトラメトリンの魚 BCF 値の推算

3.2.2.1. 材料と方法

3.2.2.1.1. 被験物質、試薬

シスならびにトランス異性体テトラメトリン（非 ^{14}C 標識体；純度各 99.7、99.4%；住友化学製）を被験物質として用いた。その他の試薬は市販品を用いた。

3.2.2.1.2. 供試生物

供試魚のコイ稚魚は、住化テクノサービス株式会社（兵庫県）から入手し1ヶ月以上馴化飼育後に供試した。馴化中は脱塩素水（上水を活性炭で脱塩素した水）を用い、16時間明/日の蛍光灯照明下で毎日市販飼料（日清製粉製）を魚体重の約2%量を給餌した。供試した個体(n=5)の体重、全長はそれぞれ1.1-1.4 g、4.4-4.5 cmであった。

3.2.2.1.3. 化学分析

コイ全身ホモジネート上清サンプル中のテトラメトリン（シスあるいはトランス異性体）の分析は高速液体クロマトグラフィー質量分析装置（HPLC-MS）により行った。HPLC-MS は Waters 社製システム（Separation Module2695 型 HPLC、Micromass ZQ spectrometer）を用い、以下の分析条件で行った。

カラム：ODS カラム Symmetry（Waters 社、3.5 μm , 3.0 mm \times 50 mm）

移動相：0.05%ギ酸含有アセトニトリル/水=8/2(v/v)

流速：0.2 mL/min

保持時間：約 3.0 min

MS 条件：ESI ポジティブイオンモード

m/z : 354 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$)

Cone 電圧：+30V

3.2.2.1.4. コイホモジネート *in vitro* 代謝試験

実験1の結果から、テトラメトリンの魚における代謝でエステル開裂が重要であることが明らかとなった。一方、カルボキシエステラーゼ活性が比較的全身各部位で見られることが知られていることから (Barron *et al.*, 1999)、魚全身ホモジネートを用いた Barron *et al.* (1999)の方法を参照して、テトラメトリンのシス体とトランス体の代謝速度を比較する *in vitro* 代謝試験を実施した。すなわち、コイのホモジネートは、魚体全身を用い、魚/pH7.4 トリス塩酸バッファー=1/5 (w/w) を試験管内、氷冷下でホモジナイズ (OMNI International 社製ホモジナイザーTH-01 型) して調製し、更に 1000g で 20 分間 (4°C) 遠心し (日立工機製小型冷却遠心機 CF7D2 型) 上清を得た。上清 2 mL ずつを 5 mL ガラスバイアルに 2 連分注し、それぞれに被験物質のテトラメトリン異性体、シスあるいはトランス体のアセトニトリル標準液 200 mg/L 液 0.01 mL をマイクロシリンジにて添加し *in vitro* 代謝試験の試験液を調製した。代謝試験はインキュベーター (トミー精工製 CLE-303 型) 内で 25±1°C、120 rpm 振とう下 (東京理化学器械 (株) 製マルチシェーカーMMS-310 型) で 5 時間行い定期的にサンプリングし被験物質濃度を分析した。

なお、各コイホモジネート上清 (n=5) のタンパク質濃度は 2.7-3.5 mg/mL (和光純薬工業 (株) 製プロテインアッセイラピッドキットワコー、島津製作所製紫外可視分光光度計 UV-2550 型、600 nm 吸光度定量) であった。

3.2.2.1.5. 代謝分解速度解析およびシス体 BCF 推算

魚ホモジネート中のシスあるいはトランステトラメトリンの代謝分解速度定数は擬一次反応と仮定して以下の関数式および実験値を用い、カーブフィティングプログラム (SigmaPlot, Version 10.0, SPSS Inc.) により解析した。

$$C_f(t) = C_f(0) \times \exp(-k_{deg} \times t)$$

$C_f(t)$: 被験物質のホモジネート中濃度 ($\mu\text{g/L}$)、

k_{deg} : ホモジネート中の被験物質代謝分解速度定数 (/day)。

シス体の魚 BCF 値の推算は、実験1で得たトランス体の BCF 値および各速度定数か

ら以下の計算式で行った。すなわち、シス体およびトランス体の構造類似性から、脂溶性等の物理化学的性質が近似し、魚からの排泄速度定数は異性体間で同様 ($k_e(trans) = k_e(cis)$) で、更にシス体とトランス体の代謝速度比は *in vitro* でのそれと同一と仮定した。

$$\begin{aligned}
 BCF(cis) &= BCF(trans) \times \frac{\{k_e(trans) + k_m(trans)\}}{\{k_e(cis) + k_m(cis)\}} \\
 &= \frac{BCF(trans) \times \{k_e(trans) + k_m(trans)\}}{\{k_e(trans) + k_m(trans) \times k_{deg}(cis) / k_{deg}(trans)\}} \quad (\text{式 5})
 \end{aligned}$$

3.2.2.2. 結果

コイホモジネート中でのシスおよびトランステトラメトリンの代謝分解速度定数 k_{deg} はそれぞれ 1.8 ± 0.51 (1.0 - 2.3)、 3.7 ± 2.6 (2.4 - 8.3) /day でありトランス体においてより速やかな分解が認められた (図 23)。その比はシス/トランスで 0.48 と算出された。

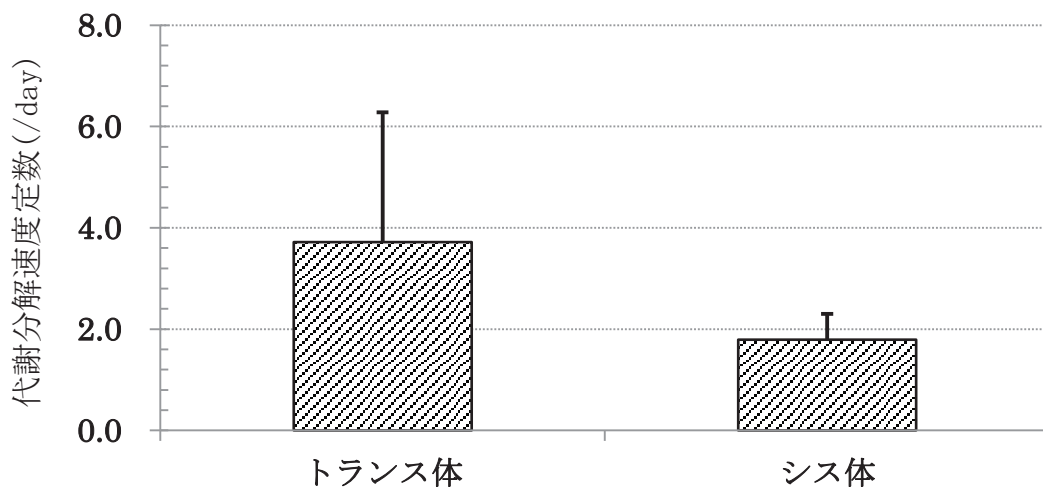


図 23. テトラメトリンのシス体、トランス体のコイホモジネート中の代謝分解速度

更に、この *in vitro* のシス：トランス代謝分解速度比 0.48 ならびに、実験 1 で得られた *in vivo* トランス体の代謝速度定数 0.41 /day から推算されるシス体の *in vivo* 代謝速度定数は 0.20 /day (0.41×0.48) と算出された。加えて、実験 1 で得られたトランス体の BCF_{ss} (180-310) および k_m (0.41 /day)、 k_e (0.55 /day) と上記の(式 5) からシステトラメトリンの BCF 値は 230 - 400 と推算された。

3.3. 考察

先ず、代謝様式に関しては、実験 1 において魚体内に様々な代謝物が認められ、魚におけるテトラメトリン代謝能の高さが示された。また確認された主要代謝様式、すなわちエステル開裂、酸化、還元、水酸化、抱合化は哺乳動物と概ね同様であったものの、哺乳動物で認められたエステル構造を保持した代謝物が魚では認められず第一段階の代謝分解としてエステル開裂が哺乳類よりも顕著と考えられた。なお、キク酸代謝物のシクロプロパン環の開環したジオール構造はテトラメトリンの哺乳動物代謝試験では検出されていないものの、キク酸のイソブテニルをエポキシ化したテトラメトリンの代謝で認められており (Smith *et al.*, 1981)、また魚においてエポキシ化の代謝経路が存在することは一般的に知られていることから (Lech *et al.*, 1985; Miyamoto *et al.*, 1990; Katagi, 2010) 妥当なものと考えられた。加えて、哺乳動物で認められなかったタウリン抱合化も他のピレスロイド化合物の哺乳動物代謝 (K. Mikata *et al.*, 2012) や様々な水生生物で認められており (Ohshima *et al.*, 1992; Katagi, 2010)、魚を含む各種生物では一般的な代謝と考えられた。

次に、BCF に関しては、実験 1 において得られたテトラメトリンの BCF_{ss} は暴露 2 週間後以降に 180-310 倍であり、テトラメトリンの脂溶性 ($\text{LogKow}=4.6$) から推算される値 (1600 倍) に比べ顕著な低値であり代謝要因の影響が確認された。これは他のピレスロイド剤においても代謝要因や膜透過性の悪さなどにより全般に脂溶性からの予測よりも BCF が低値となるとされていることとも符合する。一次代謝物も含めた速度論的解析によって得られた代謝速度定数 ($k_m=0.41$ /day)、排泄速度定数 ($k_e=0.55$ /day) から、仮に代謝がない状況下 ($k_m=0$ /day) の BCF は 310-540 ($(180-310) * 0.96 / 0.55$) と推算される。上記脂溶性からの推算値により近づくもの一致には至らず、代謝以外の要因として挙げられている膜透過性の要因に加えて、脂溶性からの予測式に対する生

物種や実験条件に関連した変動など、図 1 に示した様なその他の各種要因が関与すると推測された。なお、水中、魚体中の 1*S*、1*R* 光学異性体比はいずれも約 1:1 であったことから、光学異性体間で代謝に違いもなく BCF は同様と考えられた。

更に、*in vitro* での異性体比較代謝および BCF 推算に関しては、実験 2 の *in vitro* 代謝において確認されたトランス異性体におけるより速やかな代謝分解はテトラメトリンの哺乳動物 (Kato *et al.*, 1964; Kaneko *et al.*, 1981; Silver *et al.*, 1989) や第 2 章の実験を含む他のピレスロイド (ペルメトリン、シペルメトリン、フェノトリン) の水生生物において認められており (T. Katagi; 2010, 2012) 一致した結果と考えられた。この分解速度の違いは、ペルメトリンを用いた哺乳動物のカルボキシエステラーゼで確認されているエステラーゼのシス、トランス異性体間での酵素の感受性差 (Mikata *et al.*, 2012) によると考えられた。今回の *in vitro* 実験はテトラメトリンがラットなどで認められている全般的に高いエステル開裂代謝能を踏まえてエステラーゼ代謝分解を主眼とし魚ホモジネートを用いた。上述のとおりシス体はトランス体よりも酸化的代謝を受けやすいことから、今回エステラーゼに的を絞った *in vitro* 実験で得られた代謝速度、更にはそのデータを用いて算出したシス体 BCF 推算値は保守的なものと言える。従って、より精緻なシス体の代謝速度評価、BCF 推算・予測には酸化的酵素を適切に考慮した、例えば肝臓ミクロソームや S9 画分と補酵素を用いた *in vitro* 実験 (Fay *et al.*, 2014) の組み合わせなどが考えられる。

トレーサーを用いた濃縮・代謝試験による代謝経路や代謝物量と推移の明確化とそれを踏まえた代謝物も組み込んだ詳細な速度論的解析により、取込み速度や見かけ上の消失速度に加えてその構成要素である代謝速度と排泄速度を容易に評価することができることを今回示すことが出来た。更に、異性体など類剤の濃縮性を推算する 1 手法として、ブリッジングを考慮した簡易な *in vitro* 代謝試験での代謝分解速度比較結果を組み合わせることによって、類剤の BCF 推算が出来た。これは、*in vitro* データのみから生理学的薬物(毒物)動態 (Physiologically Based Pharmacokinetic, PBPK) モデルや速度論的 (Mass Balance) モデル (Nichols *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2007; Cowan-Ellsberry *et al.*, 2008; Weisbrod *et al.*, 2009) などを用いた BCF 予測よりも、より合理的な BCF 推算手法と考えられる。

3.4. 小括

殺虫剤テトラメトリンの構成成分であるシス、トランス異性体のうち、主成分であるトランス異性体についてブルーギル稚魚における濃縮および代謝、排泄挙動を2種類の¹⁴C標識化合物を用いて、連続流水試験系(設定濃度1 ppb、28日曝露/14日排泄)において評価した。トランステトラメトリンは魚体内でまずエステル開裂を受け、その後、アルコール側、酸側部位とも引き続いて各種代謝を受けた(N脱アルキル化、二重結合の還元、イミノ環開裂、オメガトランスメチル基の酸化、エポキシを經由した水酸化、酸側代謝物のグルクロン酸やタウリン抱合化)。生物濃縮係数BCFおよび魚体からの消失半減期はそれぞれ180-310、0.54-0.72日であった。加えて、代謝経路を踏まえて濃縮平衡時および排泄期間の一次代謝物の動態に着目し、その生成、消失挙動の速度論的解析から、トランステトラメトリンの代謝、排泄速度をそれぞれ0.41、0.55/dayと算出し代謝の寄与の大きさを定量的に明らかにした。更に、エステラーゼ活性に着目し、魚全身ホモジネートを用いて*in vitro*分解速度のシス、トランス異性体の比較を行い、それぞれ1.8、3.7/dayとトランス異性体のより速やかな分解が確認された。トランス異性体の*in vivo*のBCF値ならびにシスおよびトランス異性体の*in vitro*分解速度を用いてシス異性体のBCF値の推算を行い230-400と算出された。

第4章 混合物微量分析や代謝阻害剤を活用した濃縮性への代謝要因の推定簡便法の

検討

ーシス、トランス幾何異性体混合物であるピレスロイド系殺虫剤 *d*-フェノトリンの各異性体の魚濃縮性に及ぼす代謝影響の分別定量分析及び代謝阻害剤を用いた検討ー

4.1. 緒言

魚体内における外因性化学物質の代謝分解性が、時としてその化学物質の生物濃縮性に顕著に影響する (Lech *et al.*, 1980; Melancon *et al.*, 1977)。本章では、コイにおける代謝分解性が幾何異性体で顕著に異なることが知られている (Takimoto *et al.*, 1986) ピレスロイド系殺虫剤 *d*-フェノトリン (3-phenoxybenzyl (1*R*)-*cis, trans*-chrysanthemate、分配係数 LogKow=6.8) を被験物質として、生物濃縮係数 BCF への魚の代謝能の影響を検討した。すなわち、*d*-フェノトリンの構成成分 2 成分であるトランス、シス幾何異性体のうちトランス異性体ではエステル開裂が主代謝経路である一方で、シス異性体では酸側のキク酸のイソブテニル基末端やアルコール側のフェノキシフェニル末端の酸化が主代謝経路である (図 24)。この代謝経路の違いによる BCF の違い、あるいは代謝経路の阻害による BCF の変化の観測により生物濃縮性への代謝要因の影響を直接的に評価することを試みた。

実験 1 ではコイを用いて *d*-フェノトリンの生物濃縮性試験を行い、構成成分である幾何異性体のシスおよびトランス体を分別定量することにより異性体間の BCF の違いを検討した。実験 2 では酸化代謝酵素 P-450 の阻害剤として知られる (Casida *et al.*, 1966; US EPA, 2006) ピペロニルブトキサイド (5-[2-(2-butoxyethoxy)ethoxymethyl]-6-propyl-1,3-benzodioxole) の同時暴露による、異性体の BCF 変化から代謝分解要因の影響の検討を行った。

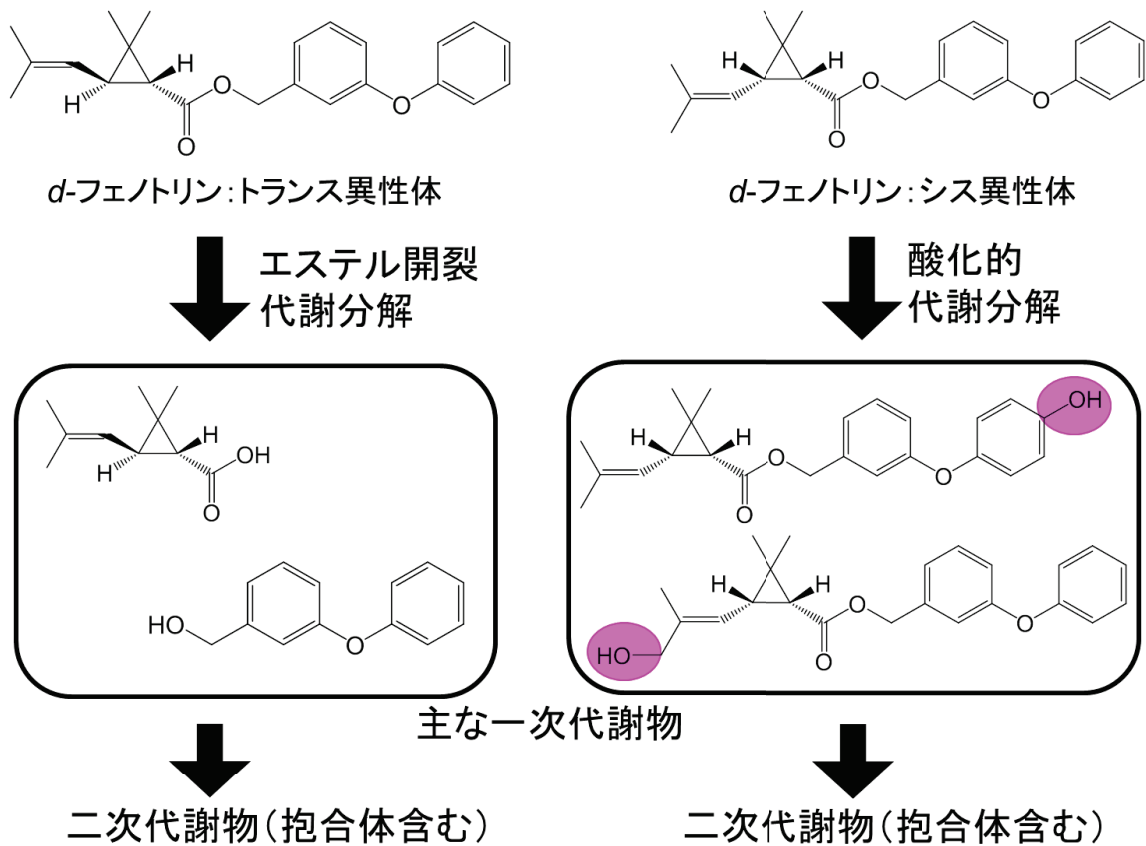


図 24. *d*-フェノトリンのシス、トランス幾何異性体の魚における主要代謝様式
(Takimoto *et al.*, 1986)

4.2. 実験

実験1 *d*-フェノトリン幾何異性体のコイにおける生物濃縮性

4.2.1.1. 材料と方法

4.2.1.1.1. 被験物質と試薬

被験物質として、シス、トランス幾何異性体の混合物である *d*-フェノトリン (図 24、住友化学製、純度 93.5%) を用いた。1*R*異性体 (*d*体) としての光学純度は 96.3% (HPLC-UV 分析 (ポンプ: Shimadzu LC-6A, カラム: Sumipax OA-2000, 移動相: ヘキサン/1,2-ジクロロエタン=500/1))、*d*-シス: *d*-トランス幾何異性体比は 1:4 (GC-FID 分析 (Shimadzu GC-9A, カラム: QF-1 Capillary column)) であった。その他の試薬は市販品を用いた。

4.2.1.1.2. 供試生物

コイは、南郷水産センター(滋賀県)から入手し試験条件に準じた環境条件下(25℃、上水を活性炭で脱塩素した脱塩素水、魚体重の2%量を給餌)で馴化飼育後に供試した。体重約20g(体長約10cm)の当歳魚を用い、脂肪含有率(Folch *et al.*, 1957; Bligh *et al.*, 1959)は平均3%であった。

4.2.1.1.3. 生物暴露試験

コイの*d*-フェノトリンへの暴露は連続流水系(換水率14.4回/日、試験温度25±2℃、16時間照明/日、pH 7±1、DO 約7 ppm)で行った。各試験区20個体を供試し、毎日魚体重の2%量を給餌した。試験系の模式図を図25に示す。

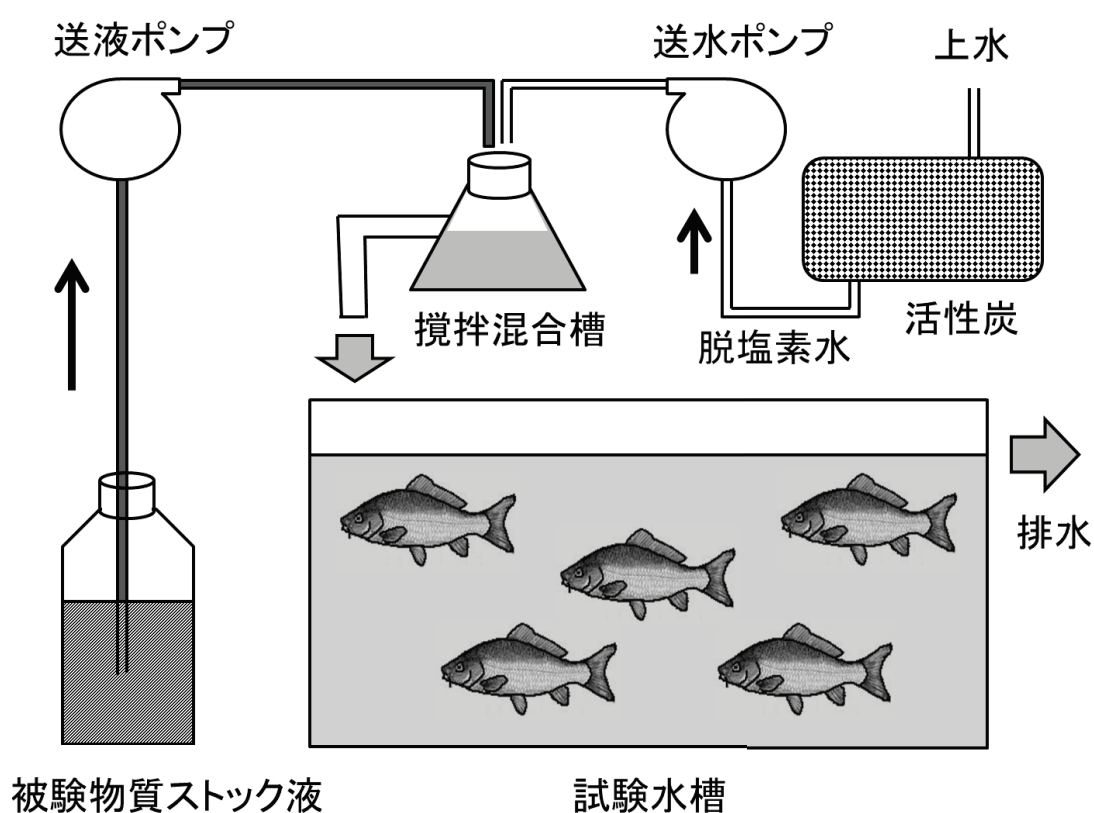


図 25. 連続流水系による魚濃縮性試験装置の概略図

設定暴露濃度は 4.3 および 0.43 $\mu\text{g/L}$ (*d*-シス異性体として 0.86 および 0.086 $\mu\text{g/L}$; *d*-トランス異性体として 3.4 および 0.34 $\mu\text{g/L}$) とした。分散助剤として硬化ヒマシ油 HCO-40(日光ケミカルズ製)を用いて高濃度の被験物質ストック液を調製した。この被験物質ストック液と脱塩素水を一定流量(東京理化学器械製ガラス微量定量ポンプ GMW-24A 型、フルマックス製ポンプ PR-D-2 型)で混合して試験水を調製した。2 暴露区に加えて助剤のみを含む対照区を設置し、試験容器として 100 L 容ガラス水槽(38×88×42 cmH、サイホン配管からのオーバーフローにより試験水槽から排水し液量維持)を用い、試験区あたり 20 尾を 8 週間暴露した。暴露期間中、定期的に水および魚をそれぞれ 2 連でサンプリングし被験物質濃度を測定した。

4.2.1.1.4. 化学分析

水分析は、1 L のサンプルを XAD-4 樹脂(オルガノ製)を充填したガラスカラムに通水することにより固相抽出し、その後 50 mL のアセトンで溶出して濃縮乾固後にヘキサン 2 mL に再定容し GC-MS 分析にて行った。

魚分析においては、前処理として魚全身サンプルをハサミあるいはナイフを用いて細切片化した後、同重量の水/メタノール(1/1, v/v)を加えてホモジナイズ(Ace Homogenizer、日本精機製)し、ヘキサンで 3 回(100, 50, 50 mL)抽出(振盪後 2700 rpm 遠心分離)した。ヘキサン抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水後に濃縮乾固し、その後ヘキサン・アセトニトリルによる液・液分配、順相(充填剤: Florisil PR、溶出液: ヘキサン/ジクロロメタン/酢酸=100/50/1, v/v/v) および逆相(充填剤: Nakarai Cosmosil C18、溶出液: メタノール/水=9/1, v/v) カラムクロマトグラフィーにより精製し脂肪等の夾雑物を除去した。精製サンプルは濃縮乾固後ヘキサン 2mL に再定容し GC-MS 分析に供し *d*フェノトリンのシス、トランス幾何異性体の分離定量を行った。GC-MS 分析では島津製作所製 QP-1000 型(電子衝突イオン化法)と GC カラム、QF-1 on chromosorb AW DMCS を用い、検出 m/z は水分析では 183 (3-フェノキシベンジルフラグメントイオン)、魚分析では 350 (フェノトリン分子イオン))とした。

水、魚分析法の添加回収実験(水 4.3 および 0.43 $\mu\text{g/L}$ 、魚 0.25 mg/kg)による回収率は 90%以上であった。

4.2.1.2. 結果

暴露水中のシスおよびトランス異性体は、ほぼ設定を維持し（図 26）、実測平均濃度は高濃度区でそれぞれ 0.72、3.3 $\mu\text{g/L}$ であり設定濃度 0.86、3.4 $\mu\text{g/L}$ の 84、97%であった。また、低濃度区では、それぞれ 0.084、0.31 $\mu\text{g/L}$ で設定濃度 0.086、0.34 $\mu\text{g/L}$ の 98、91%であった。

暴露期間中、供試魚に異常、毒性症状は見られず、魚体中の被験物質濃度はシス、トランス異性体とも速やかに上昇して、2 週間後には平衡状態に達し、その後ほぼ一定の値で暴露 56 日まで推移した（図 26）。

水中濃度および魚体中濃度から計算される各魚個体サンプルにおけるシス体、トランス体の BCF 値はそれぞれ 330~730、210~530 であった。シス体においてトランス体よりも有意な高値が認められた（t 検定、 $p=0.01$ ）。このシス体の BCF の高値をより明確に評価するために各個体別 BCF 値のシス体/トランス体の比を算出したところ 1.1~2.2 (1.4 ± 0.25) であった（表 15）。

なお、シス体、トランス体ともそれぞれ高濃度区と低濃度区の間で BCF 値に濃度依存的な違いは認められなかった（シス体：330-610、330-730；トランス体：270-400、210-530）。

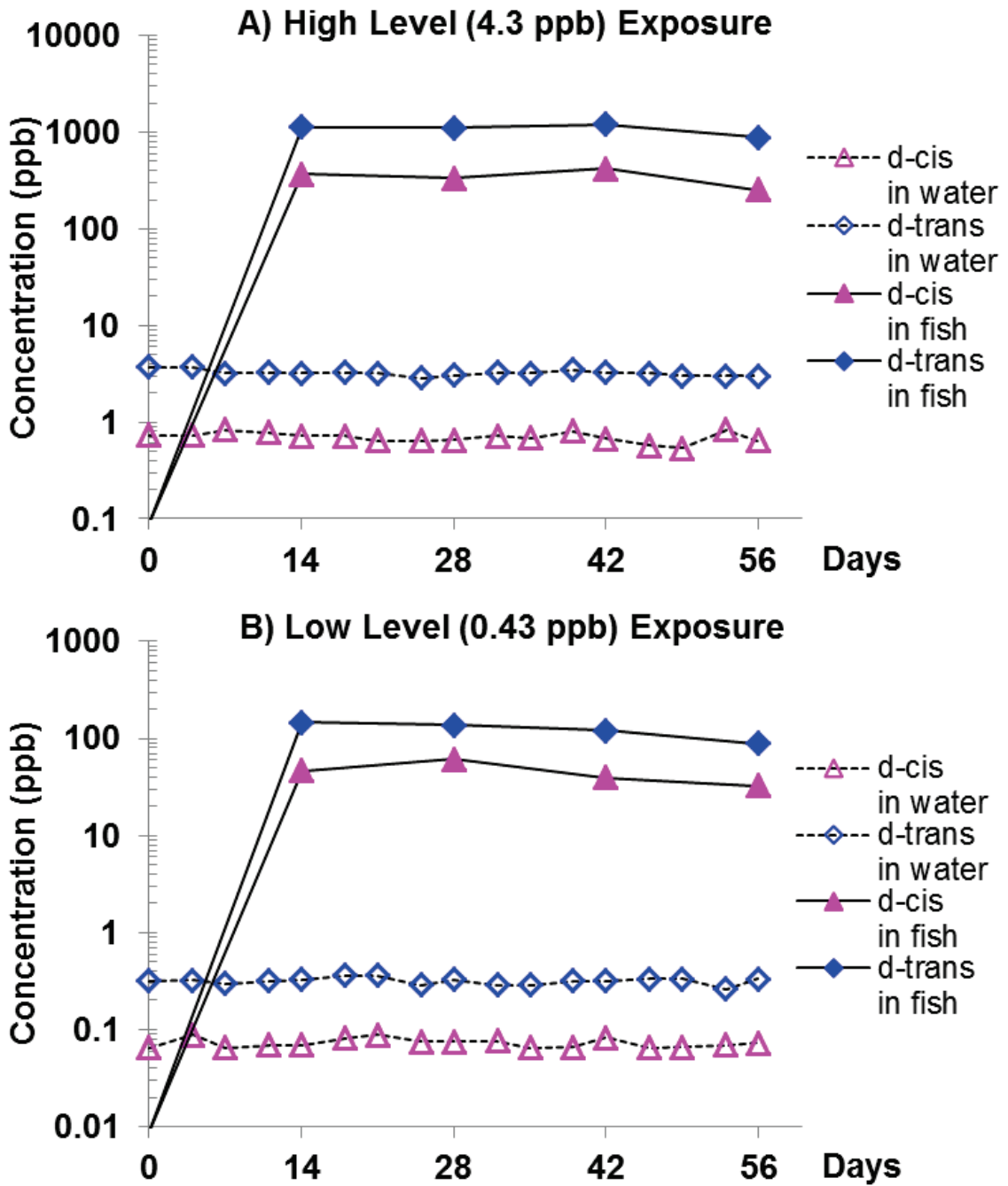


図 26. *d*-フェノトリンのコイ濃縮性試験における高濃度区(A)、低濃度区(B)の水中および魚体中のシス、トランス幾何異性体の濃度推移

表 15. *d*-フェノトリン幾何異性体、シスおよびトランス体のコイ各個体の BCF 値

暴露 日数	コイ 個体	高濃度区、4.3 ppb 暴露 (シス 0.86、トランス 3.4 ppb)			低濃度区、0.43 ppb 暴露 (シス 0.086、トランス 0.34 ppb)		
		BCF		BCF 比*	BCF		BCF 比*
		シス	トランス		シス	トランス	
14 日	A	480	330	1.5	490	320	1.5
	B	480	360	1.3	670	500	1.3
28 日	A	450	370	1.2	660	290	2.2
	B	470	320	1.5	730	490	1.5
42 日	A	610	400	1.5	380	280	1.4
	B	530	400	1.3	600	530	1.1
56 日	A	330	270	1.2	500	340	1.5
	B	420	320	1.3	330	210	1.6

*: シス/トランスの BCF 比。

実験 2 酸化酵素阻害剤ピペロニルブトキサイドによる *d*-フェノトリン幾何異性体の BCF 変化

4.2.2.1. 材料と方法

被験物質、供試生物、暴露条件、化学分析は基本的に実験 1 と同様な手法を用いた。但し、暴露区は 1 濃度区とし、実験 1 の低濃度区と同一の *d*-フェノトリン設定濃度として 0.43 µg/L (シス体 0.086 µg/L、トランス体 0.34 µg/L) のみとした。更に、酸化代謝酵素 P-450 の阻害剤として知られるピペロニルブトキサイド (PBO、和光純薬製、図 27) を被験物質と混合して試験水に添加することにより、コイを *d*-フェノトリンと PBO に同時に暴露 (PBO 設定濃度 1 mg/L) し、暴露期間は 4 週間とした。

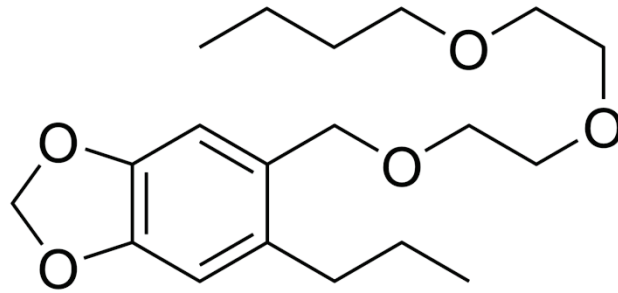


図 27. ピペロニルブトキシドの化学構造 (US EPA, 2006)

4.2.2.2. 結果

暴露水中のシスおよびトランス異性体濃度は、ほぼ設定を維持し (図 28)、実測平均濃度はそれぞれ 0.080、0.34 $\mu\text{g/L}$ であり (設定濃度 0.086、0.34 $\mu\text{g/L}$ の 93、100% であった。

暴露期間中、供試魚に異常、毒性症状は見られず、魚中の被験物質濃度はシス、トランス異性体とも速やかな上昇の後、実験 1 と同様に 2 週間後には平衡状態に達したものの、実験 1 と異なり、シス体濃度はトランス体濃度よりも高値であった (図 28)。実験 1 と比較するとトランス体濃度がほぼ同程度であった一方でシス体濃度は顕著な高値であった。そして、各供試魚個体の BCF 値はシス、トランス異性体それぞれ 2400 ~ 3800、190 ~ 320 であり、同一個体でのシス、トランスの BCF 比は 11 ~ 20 (14 \pm 4.2) であった (表 16)。

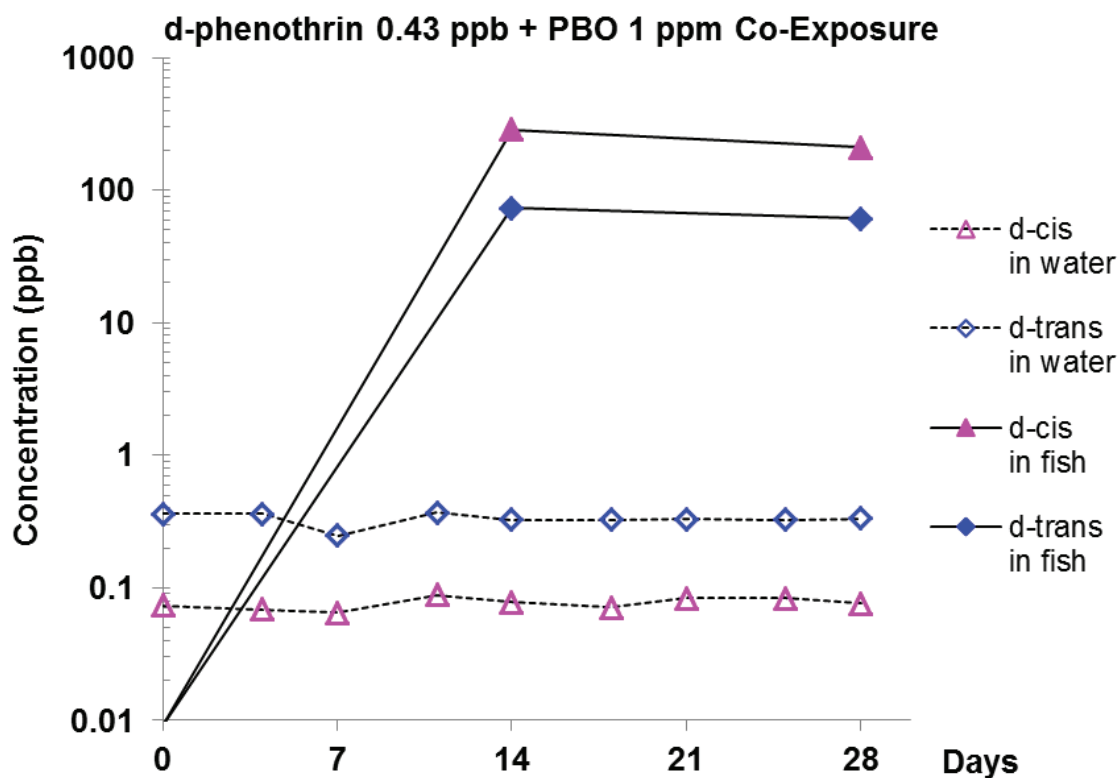


図 28. PBO 同時暴露時の *d*-フェノトリン幾何異性体、シスおよびトランス体の水中およびコイ魚体中濃度推移

表 16. PBO 同時暴露時の *d*-フェノトリン幾何異性体、シスおよびトランス体のコイ各個体の BCF 値

暴露 日数	コイ 個体	<i>d</i> -フェノトリン設定濃度 0.43 ppb (シス 0.086、トランス 0.34 ppb)		
		BCF		BCF 比*
		シス	トランス	
14 日	A	3800	190	20
	B	3600	320	11
28 日	A	2600	210	12
	B	2400	200	12

*: シス/トランスの BCF 比。

4.3. 考察

実験1の、シスおよびトランスの幾何異性体混合物である *d*-フェノトリンに暴露したコイにおける各成分の BCF 値の評価において、異性体間の BCF 値に有意な差が認められた。異性体間の物理化学的性質（脂溶性）の類似性から、この BCF 値の違いの主要因はこれまでも魚で確認されている代謝差 (Takimoto *et al.*, 1986) によると考えられた。高濃度区およびその 1/10 濃度である低濃度区においても BCF 値は同様に濃度依存性も認められず代謝阻害等による変化もなかったと考えられた。BCF 値のシス/トランス比は 1.1-2.2 でありトランス体における高代謝能による BCF 低下が示され、これは過去の哺乳類代謝 (Izumi *et al.*, 1984) においてトランス体がシス体に比べてより速やかに代謝される結果と一致する。

また、実験2における酸化代謝酵素の阻害剤共存下における暴露試験において、シス体の BCF 値は実験1の通常条件下 (BCF330-730) に比べ顕著な上昇 (BCF2400-3800) が認められた。一方、トランス体において変化は殆ど認められず、シス体とトランス体の魚での主要代謝様式がそれぞれ酸化、エステル開裂 (図24) と良く符合する。更に、実験2におけるシス体 BCF は代謝が完全に阻害されたものと仮定し、以下の速度論的な BCF の記述式と、実験1、2のシス体の BCF 実測値から代謝速度と排泄速度の比 (k_m/k_e) を推算したところ、2.3-11 と推算された。この比率から BCF への代謝の寄与が高いことが確認された。

$$BCF = k_u / (k_e + k_m) \quad (\text{式 6})$$

k_u : 魚の化合物取込み速度定数

k_e : 魚の化合物排泄速度定数

k_m : 魚の化合物代謝速度定数

加えて、既存の魚における取込み速度 k_u の推算式を適用すれば、上記の速度論的關係式と BCF 値および PBO 同時暴露による代謝分解阻害時(代謝速度 $k_m=0$)のシス体 BCF 値から各異性体の代謝速度を概算することが可能である。取込み速度の推算式については供試魚の体重や化合物の脂溶性を記述子とした様々な推算式が提唱されているが (Crookes *et al.*, 2011)、その中でも良く知られたものとして OECD 魚濃縮性試験ガイドラインでも引用されている Sijm *et al.* (1995) の提唱する以下の推算式を用いて取

込み速度定数を推算した。

$$k_u = 520 \times W^{-0.32}$$

W: 魚体重(g、今回の実験では 20 g)

この推算取込み速度ならびに、上記の(式 6)と実測平均 BCF 値から排泄および代謝速度を推算した(表 17)。この推算からは取込みおよび排泄速度定数はそれぞれ 200 L/kg/day、0.064 /day と算出され、最終的に代謝速度と排泄速度の比 (k_m/k_e) はシス体、トランス体それぞれ 5.1、7.7 と計算でき、やはり前述のとおり代謝の寄与が高いことが示された。

表 17. 取込み速度推算式および実測平均 BCF 値を用いて推算した *d*-フェノトリンのシス、トランス異性体の代謝、排泄速度

	実験 1		実験 2	
	シス	トランス	シス	トランス
実測平均 BCF 値 (SD%)	510 (23%)	360 (25%)	3100 (23%)	230 (26%)
k_u (L/kg/day)	200			
k_m+k_e (/day) [消失半減期]	0.39 [1.8 日]	0.56 [1.2 日]	0.064 [11 日]	0.87 [0.80 日]
k_e (/day)	0.064			
k_m (/day)	0.33	0.49	0	0.80
k_m/k_e	5.1	7.7	—	12

備考： k_m+k_e は k_u/BCF から算出し、実験 2 のシス体は $k_m=0$ とし、両異性体の脂溶性の類似性から k_u および k_e は異性体で同一とし、 k_m は k_m+k_e と k_e の差から算出し、消失半減期は $\ln(2)/(k_e+k_m)$ から算出。

上述の速度定数の推算は、絶対値としての定量解析性には前提や制約はあるもの、

特に同一或いは類似条件下の化合物比較などにおいては、代謝阻害剤を組み合わせた条件下の濃縮挙動を解析することにより濃縮性への代謝要因を直接的に容易に比較解析することができると考えられる。今回は酸化代謝酵素の阻害剤である PBO を用いたが、その他の様々な阻害剤を応用すれば、より詳細かつ広範囲に濃縮性への代謝要因の影響を評価することが可能と考えられる。

なお、実験 1 と 2 の詳細なトランス体 BCF 値の比較（同一暴露濃度）を行った場合、それぞれ 210-530 倍 (370 ± 120)、190-320 倍 (230 ± 61) と、平均値では実験 2 が僅かに低値となる。t 検定を行ったところ有意な違い ($p < 0.05$) が認められ、PBO 供暴露条件下でエステラーゼ酵素誘導などによる体内濃度低下の可能性は否定できない。しかしながら、実験 2 のデータ数も少なく生物試験の試験間の変動の可能性もあり、より正確な判断には追加の確認が必要と考えられた。

4.4. 小括

コイ当歳魚をトランス、シス異性体の混合物 (4:1) である殺虫剤 *d*-フェノトリンに連続流水下で暴露し各異性体の生物濃縮係数 BCF を検討したところ、トランス体よりもシス体の BCF は 1.1-2.2 倍有意に高値であった。異性体間の物理化学的性質の類似性からこの BCF 値の違いは各異性体の魚における代謝能の違いによると考えられた。更に酸化酵素阻害剤であるピペロニルブトキサイド共存下で各異性体の BCF を評価したところ、トランス体では阻害剤の有無による顕著な変化は無かったものの、シス体では BCF 値の顕著な上昇が認められた。このことから、シス異性体の酸化代謝の大きさと代謝の BCF への寄与が大きいことがうかがえた。また、この BCF 値の違いから代謝速度と排泄速度の比は最大 2.3-11 倍と見積もられ、代謝分解要因が *d*-フェノトリン幾何異性体の生物濃縮性に大きく寄与していることが示された。加えて、魚体重に基づく取込み速度推算式と代謝阻害時のシス体 BCF から算出された *d*-フェノトリンの取込み、排泄速度はそれぞれ 200 L/kg/day、0.064 /day 推算され、更に、BCF 値からシス体、トランス体の代謝速度はそれぞれ 0.33、0.49 /day と推算された。

第5章 総合考察

5.1. 代謝要因有無での BCF 差異比較

第2、3、4章で取り上げた各化合物、生物種、検討における代謝要因での BCF の差異について、表 18 に易代謝、難代謝のケースをそれぞれ示した。

表 18. 代謝要因での BCF の差異データまとめ

化合物	Log Kow	魚 BCF 推算値*1	生物	BCF	
				易代謝ケース	難代謝ケース
ピリダリル	8.1	3900- 6700	節足動物	72 (ユスリカ類)	1200 (ヨコエビ類)
[体内致死濃度活用の推算]					
テトラメトリン トランス異性体	4.6	550- 720	魚 (ブルーギル)	180-310	310-540 [速度論解析 推算値： 代謝速度 0]
テトラメトリン シス異性体				230-400 [<i>in vitro</i> データ 活用推算値]	
<i>d</i> -フェノトリン トランス異性体	6.8	340- 510	魚 (コイ)	210-530	2400-3800 [代謝阻害剤 共存下]
<i>d</i> -フェノトリン シス異性体				330-730 (1.1-2.2 倍*2)	

*1: EPI Suite での推算値、*2: トランス異性体に対する BCF 倍率

生物濃縮性の様々な支配・影響要因として図 1 に示したような、化合物や生物の性質や特徴による違いは種々あるものの、いずれの化合物においても代謝要因の有無による BCF の違いが明確化できる。すなわち、ピリダリルにおいては、代謝能の高いユスリカ類と低いヨコエビ類で推算値として約 70 倍の BCF の違いが推定された。また、テトラメトリンでは代謝速度を仮に 0 とした速度論的解析により得られた推算値は、

およそ 2 倍の高値となることが試算された。p-フェノトリンにおいては代謝ルートの違いからコイの同一個体中においてシス、トランスの幾何異性体間で 1.1-2.2 倍の差が確認でき、更に代謝阻害剤共存下において BCF は 10 倍前後高値を示し、代謝要因の BCF に及ぼす影響を明確化することができた。この様に、いずれの実験においても代謝要因の BCF への寄与を定量的に評価することが出来た。

5.2. 代謝要因を考慮した生物濃縮性精緻評価のための簡便手法の蓄積

第 1 章で述べたように、生物濃縮性の予測・評価は、これまでに蓄積された膨大なデータや理論、技術の集積により進展し、様々な予測手法が提唱されている。しかしながら、対象となる化学物質や生物の多様性、生物濃縮性メカニズムに関連する不確実性等から万能で高精度・広適用性の予測手法の構築は現実的には困難と考えられる。現時点では様々な項目に着目し適用範囲を絞った個別評価手法の組み合わせが肝要と考えられ、代謝要因に関連した濃縮性評価精緻化が、大きな課題の 1 つである。

第 2、3、4 章における色々な生物種や実験手法、解析アプローチによって様々な形で水生生物による化学物質代謝能が生物濃縮性に及ぼす影響を示すことができた。本研究により、標準生物である魚のみならず多様性を有し標準的試験法・標準種の定まっていない節足動物における代謝、生物濃縮性の多様性を確認することが出来た。更には、改めて生物濃縮性の評価や予測における代謝要因の考慮、組み込みの重要性を再認識することが出来たと考える。本研究において活用・構築した代謝要因解明に関する手法の有用性・活用性と留意点について以下に考察する。

① 毒性値および体内致死濃度からの BCF 推算と生物間の簡便比較

第 2 章においては昆虫ユスリカと甲殻類ヨコエビ間における毒性、代謝能、体内致死濃度の大きな違いを基に、それぞれの生物種について毒性値と体内致死濃度から BCF を推算した。更に、これを既存の野外池での各種生物の生物濃縮性観察データと比較検証した。そして、具体的な生物種は実験室と野外で異なるものの、実験室での試験で得られた昆虫や甲殻類の代謝能や推算 BCF レベルの野外データとの類似性を示すことができた。種数も多く、生態や生理（食性、生長、変態）も多様で指標種や標準試験法の確立されていない節足動物について、これまで多種多様な試験条件下で BCF が

評価されているため変動の大きなデータとなっていると思われる。今回構築した、比較的短期間で標準的条件下において簡便に得られる毒性、体内致死濃度データからの推算 BCF は、非標準生物の評価やデータ検証・ブリッジングなどに有用と考えられ、非標準種の生物濃縮性評価に今後更なる展望が開けたと考える。また体内致死濃度についてはこれまで、作用性やバイオアベイラビリティ、毒性機構解明などに多く用いられていたが、今回の手法の様な BCF 評価等への応用によって、今後、データ蓄積、検証、更なる活用の推進に寄与すると考えられる。

なお、第 1 章で挙げた生物濃縮性に及ぼす生物や試験条件の要因は毒性試験や体内致死濃度にも影響を及ぼし得ることから、特に多様な節足動物では独特な生態や生理の実験デザインへの適切な考慮が重要と言える。例えば、Buchwalther *et al.* (2002, 2003) のクロルピリフォスを用いた取込み速度の違いを見た例では、様々な分類の水生昆虫（ユスリカ類 (*Chironomus riparius* Meigen, *Psectrotanypus* sp.）、ミズムシの一種 (*Sigara washingtonensis* Hungerford)、カゲロウの一種 (*Callibaetis* sp.）、ガムシの一種 (*Berosus* sp.）、マツモムシの一種 (*Notonecta kirvyi*)、ガガンボの一種 (*Ptychoptera* sp.）、トビケラの一種 (*Dicosmoecus gilvipes* Hagen)) において体サイズ(2.4-65.1 mg)や呼吸様式(鰓呼吸、空気呼吸等)による違いや、カゲロウの一種 (*Cinygma* sp.）、ミズムシの一種 (*S. washingtonensis*) で高温条件 (8.5-13°C) で取込み速度上昇などが認められており、種間の比較において留意が必要と考えられる。その他、致死生物体内濃度に関して生物の脂質含量差や水質条件・暴露期間・暴露濃度差の影響の有無などの事例もあり (van Wezel *et al.*, 1995; Fisher *et al.*, 1999; Deneer *et al.*, 1999)、予備試験や条件を変えた検証なども状況に応じて必要と考えられる。

② 代謝様式を踏まえた 1 次代謝物動態からの速度論的解析による代謝速度定数評価

これまでに生物濃縮性予測のための代謝速度評価で良く用いられている *in vivo* 試験における代謝速度の推測は、Arnot *et al.* (2008) が提唱する速度論的物質収支 (kinetic mass balance) モデルが多く用いられている。すなわち、生物濃縮性試験で得られた BCF 値、排泄半減期、取込み速度定数に加えて魚体重、脂肪含有率、試験温度、化合物物化性(Kow) などから複雑なシミュレーションにより代謝速度定数は推算されている。

本研究の第3章の実験では、代謝経路を踏まえて1次代謝物とその挙動に着目し環境代謝挙動評価試験で定型的に活用されているコンパートメントモデルシミュレーション(Kodaka *et al.*, 2004)を簡便に活用し代謝速度定数を推算できた。この手法の応用によって、更に簡便な代謝速度の推算あるいは容易なデータ検証の手法に展望が開けたと考えられる。場合によっては、2次代謝物の消長・濃縮動態が同様に解析できればそれら代謝物自体の生物濃縮性についても親化合物の濃縮・代謝試験によって評価でき、活用性の更なる広がりも期待できる。

③ *in vivo* 試験とブリッジング *in vitro* 代謝試験を組み合わせた類縁体の BCF 推測

生物濃縮の予測については物理化学性等からの QSAR に加えて、代謝要因の重要性と予測不確実性、動物愛護や *in vivo* 試験の煩雑性などから *in vitro* データの有効活用も重視されており、各種生理パラメータとともに生理学的薬物(毒物)動態(Physiologically Based Pharmacokinetic-Toxicokinetic, PBPK)モデルや速度論的(Mass Balance)モデル QSAR への組み込みなどが種々検討されている(Nichols *et al.*, 2006, 2009, 2013; Han *et al.*, 2007; Cowan-Ellsberry *et al.*, 2008; Weisbrod *et al.*, 2009; Gomez *et al.*, 2010; Brinkmann *et al.*, 2014)。これらの手法は現在においても一定の予測には用いられているものの、様々な試験条件に関連した不確実性・変動要因(化合物、生物、試験条件)から、実際の *in vivo* 試験結果との不一致やオーダーを超えた乖離の可能性も否定できず、今後も更なる改良、精緻化が望まれている。従って、*in vitro* データでの高精度・広範な BCF 予測、評価にはまだ検討を要する状況と考えられる。第3章では、物理化学的性質が類似した化合物について、*in vivo* 試験において得た BCF および取込み、排泄、代謝速度と代謝速度比較 *in vitro* 実験データから速度論的に構造類似物質の BCF を推測することが出来た。従って、直接関連する化合物の *in vivo* 試験結果や *in vitro* 実験結果を融合させた推算値は半実測データであり、構造や物理化学的性質などからの QSAR や PBPK モデルからの予測値などよりも本手法は信頼性が高いと考える。

このような、カギとなる化合物の *in vivo* データと関連化合物群の *in vitro* 比較データを組み合わせた解析手法は、一連の類似化合物群の効率的な評価に有用と考える。例えば、第1章で触れた EU での各種化学物質の登録承認審査において細部評価を要求され得る微量不純物や環境代謝物などで構造類似化合物あるいは置換基数など順列の

ある一連の化合物群の効率的な評価に活用可能と考えられる。更に、後述の体内致死濃度も活用すれば、一連の類似化合物群の魚毒性値の簡便予測等にも展開が図れると考える。

なお、*in vitro*代謝試験デザインには組織スライス、胚、培養細胞、組織ホモジネートや各種細胞内画分など様々なものがあり(Weisbrod *et al.*, 2009)、対象化合物の物理化学的特徴や代謝様式などを考慮して選択すべきと考えられる。また、魚種や補酵素(F. Liu *et al.*, 2012)あるいは化合物処理様式(Lee *et al.*, 2014)による差異も考えられ、単独の*in vitro*実験結果よりもむしろ、今回の手法のような同時比較あるいは基準物質を組み合わせた比較・標準化なども留意すべきと考えられる。

④ 代謝阻害剤を用いた代謝寄与度検証や速度パラメータ推算

第4章の実験において代謝阻害剤として用いたPBO等の代謝阻害剤は農薬や防疫薬の効力増強剤としても用いられており(US EPA, 2006)、様々な効力関連研究とは別に阻害剤を用いた水生生物における代謝分解挙動や毒性の変化に関する研究は*in vitro*実験なども含め各種あるが(Kagan *et al.*, 1987; Pathiratne *et al.*, 1998; Weinstein *et al.*, 2008)、生物濃縮性変化についての直接的な研究例は少ない。Lu *et al.* (1977)の水/底質系のモデルエコシステム内でのPBOによるベンツピレンのカダヤシにおける食物連鎖も含んだ生物濃縮係数(水中濃度に対するBAF)の上昇事例や、2,8-ジクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン(TCDD)やペンタクロロベンゼンの金魚を用いたPBO有無における体内濃度変化や排泄速度の変化を観察した事例(Opperhuizen *et al.*, 1990; Sijm *et al.*, 1993)などが挙げられる。今回の実験では関与する代謝酵素の違いから、同時に暴露した2成分の変化を直接的に比較し、代謝要因のBCFレベル決定への寄与の程度や大きさを評価できており、前例も稀有な有用な手法と言える。

代謝阻害剤としてはPBO以外にも様々な化合物が知られており、*iv vivo*実験ではBis(*p*-nitrophenyl)phosphateによるdi-2-ethylhexyl phtharateのシープスヘッドミノーでのエステル開裂阻害(Karara *et al.*, 1998)や、salicylamideによるpentachlorophenolのニジマスでの硫酸、グルクロン酸抱合化阻害(Stehly *et al.*, 1989)事例が、また、*in vitro*実験ではNaphthoflavone、1-benzilimidazole、clotrimazole、cimethidine、ellipticineなどの阻害挙動の検討事例(Miranda *et al.*, 1998)もある。従って、最適な阻害剤の組み合わせにより広範な化合物の代謝阻害下の

生物濃縮性確認が可能であり、以下などの生物濃縮性の精緻な解明に活用できると考
える。

- ・Dimitrov らの Baseline model (表 4) 等の代謝要因を除外した BCF 予測式
の検証や校正
- ・代謝要因以外の供試魚要因 (魚種や脂肪含有率) の解明
- ・試験条件 (試験温度や水質) による BCF 変化の検証、解明

加えて、今回の実験では同一生物サンプルでの分別定量分析により、生物に由来す
る変動要因を軽減した評価を実施できた。今日では、LC-MS/MS、GM-MS/MS、LC-NMR な
どの様々な高度な微量分析機器が開発されて来ており、今後益々、微量分析技術を活
用した評価法の進展が期待される。

また、第 4 章において用いた取込み速度定数の既存推算式を活用すれば、阻害剤の
有無における BCF 変化から簡便に代謝速度や排泄速度を推算できることから、それら
のパラメータを用いて脂溶性の同様な類剤の速度論的な BCF 推算にも活用性は広がり
得ると考える。

本研究で検討した手法を活用した複数の類縁体や非標準生物種の効果的 BCF 評価簡
便策オプションのマトリックス、すなわち長期間・高額を要する *in vivo* の BCF 試験
を省略した簡便評価策を図 29 に示す。

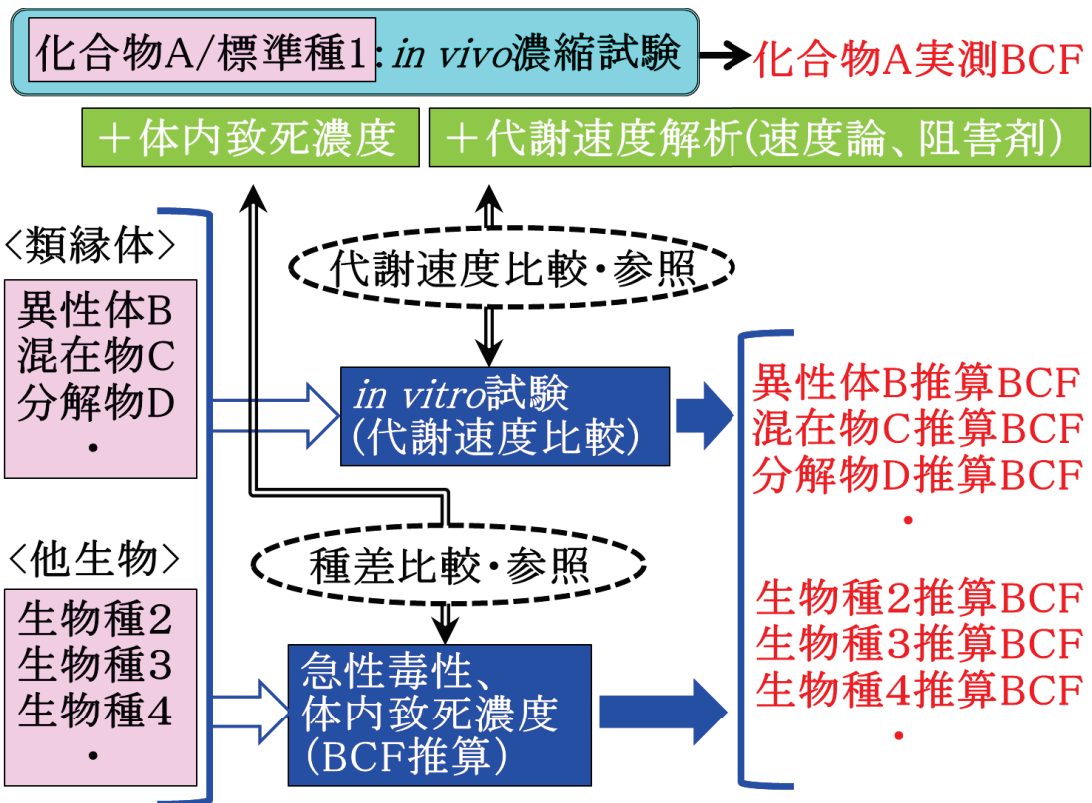


図 29. 類縁体、多様な生物種の BCF 簡便評価マトリックス

評価対象として化合物 A とその類縁体として異性体 B、製品混在物 C、分解物 D があるケースで、化合物 A の濃縮性試験での BCF 評価に加えて速度論的解析あるいは代謝阻害剤実験により代謝速度を解析し、それら化合物 A のデータを踏まえて類縁体では簡易な *in vitro* 試験から代謝速度を比較して各類縁体の BCF を簡便に推算し比較評価できる。他方、標準種以外の生物種の評価を要する場合でも、標準種の BCF に加えて体内致死濃度を把握し、非標準生物種の毒性と体内致死濃度を評価し、化合物 A のデータと比較、解析することにより非標準生物種の BCF を簡便に推算し比較評価できる。これらのデータと BCF の規制基準レベルを踏まえて判断あるいは優先順位付けを行い、必要と考えられる類縁体や非標準生物種のみ *in vivo* 試験を追加実施することで効率的な総合評価が行えると考えられる。

5.3. 今後の展望

化学物質の生物濃縮性評価の今後の更なる高度化・効率化に向けての研究や規制上

の評価手法等の方向性提案や議論や研究が、世界の各地域や国際的枠組み・連携などにおいてなされており、動物愛護と相まって、やはり予測関連ツールや簡易評価手法の拡充・応用、様々なデータや生物群も含めた総合評価などの方向性がうかがえる。

すなわち、欧州においては、欧州委員会直属の共同研究センター(Joint Research Center, JRC)の欧州動物試験代替試験法標準研究所(EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing, EURL ECVAM)がまとめた魚類を用いた各種試験の代替戦略に関する報告書(EC JRC ECVAM, 2014)の中で、魚 BCF 試験数の削減戦略として以下が示されている。

- ①細胞あるいは胚を用いた Toxicokinetics による生物濃縮性予測
- ②代謝情報を活用した BCF 予測モデルの改良
- ③生物数削減に有用な簡易試験法活用など含めた OECD305 ガイダンス作成

また欧州化学工業連盟(CEFIC)においても化学物質安全性評価研究関連研究の長期支援取り組み(Long-Range Research Initiative, LRI)の生物濃縮性専門家ワークショップにおいて以下が今後の重要項目として挙げられている(Nichols *et al.*, 2015)。

- ①評価法の改良と、BAF、BMF、TMF、排泄半減期などの項目の解明の継続。
- ②現状において変動性の高い野外データの精緻化、活用。
- ③経口での生物濃縮性を踏まえた BCF からの BMF などのモデル化。
- ④生物濃縮性の不確実要因である代謝速度に関する更なる研究や改良、更に代謝速度予測モデルのための *in vivo* データベースや QSAR など *in silico* モデルの増加、適用拡大や *in vitro* からの *in vivo* 外挿手法の発展。
- ⑤様々な実際のデータの重要性を踏まえた総合評価、いわゆる Weight of Evidence アプローチの活用。

日本においては、経済産業省から 2015 年 3 月に公表された「15 年後を見据えた化学物質管理分野における動向調査報告書」(JFE テクノリサーチ株式会社, 2015)において、生物濃縮性評価関連事項としては技術到達目標には動物試験の最小化、QSAR 積極活用、非動物試験の高精度・迅速評価拡充等が挙げられ、具体的な優先課題として以下の項目が挙げられている。

- ①魚類細胞等を用いた濃縮性評価手法
- ②濃縮性評価 QSAR の対象拡大、精度向上

一方、OECD では、2015 年 7 月時点での各種ガイドライン計画(OECD, 2015)において

生物濃縮性に関連して以下の項目が挙げられている。

- ①魚濃縮性試験法 OECD305 のガイドンス作成
- ② *in vitro* 魚肝細胞代謝の新ガイドライン作成

また、国際生命科学研究機構 環境保健科学研究所 (International Life Sciences Institute, Health and Environmental Science Institute, ILSI HESI) の技術委員会の 1 つに生物濃縮性評価における段階的アプローチ手法開発が挙げられ、OECD や CEFIC などとも連携した以下の取り組みが行われている (ILSI HESI, 2015)。

- ① *in vitro* 評価手法の改良や *in vivo* での代謝予測モデル開発
- ② 既存 *in vivo* 評価法の改善領域の特定
- ③ 代謝要因を組み込んだ新機構モデル構築
- ④ 陸域生物濃縮性評価

それらの取り組みの一環として、生物数削減のための既存 BCF 試験データ解析による簡易 1 濃度暴露試験有効性の確認 (Creton *et al.*, 2013; Burden *et al.*, 2014) や、ニジマス肝細胞を用いた *in vitro* 代謝速度評価試験の信頼性、再現性評価、標準化も検討されている (Fay *et al.*, 2014)。加えて、環境毒性化学会 (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) にもアドバイザーグループ (Global Advisory Groups: Bioaccumulation Science) を設置し、各種の生物濃縮性評価に関連する国際的な活動に関与している (SETAC, 2015)。

生物濃縮性の要因に示した様々な複雑さや生物試験に由来する変動性などから、単独データでの判断よりもむしろ CEFIC の挙げた様々なデータに基づく総合評価は重要なアプローチと考えられ、総合評価の一環としても、今回検討した手法の活用が期待される。

上記の国際的な研究活動においては、代謝要因を考慮した様々な *in vitro* や関連データベース、速度論的解析関連手法等が検討項目として挙げられている。今後、それらについては今後の高度に洗練された体系や手法、データベースの整備が期待される。一方で、その他の手法や生物種の多様性に関しては、関連する項目としては経口濃縮や陸域生物濃縮性などに限られていることから、体内致死濃度の魚での更なる活用や、節足動物の生物濃縮性の多様性の研究の積み重ねが有用と考える。すなわち、以下の項目などに関して、代謝能、毒性、体内致死濃度の変化からの生物濃縮性の変動性や規則性、生物種間の順位付けなどの解明により、魚類や水生節足動物、更には陸生生物の関係性などについて生物濃縮性の

更なる解明に向けての今後の検討が期待される。

①色々な魚種における生物濃縮性の変動性の精度高い評価:

一般に感受性が高いとされる冷水魚のニジマスと、温水魚標準種のコイやブルーギル、ゼブラフィッシュなどの生物濃縮性の変動レンジや傾向の明確化、更には代謝阻害剤による毒性変化からの BCF 予測

②多様な水生昆虫、甲殻類の生物濃縮性の種間差評価:

代表的な水生昆虫(ユスリカ、ヤゴ、ゲンゴロウなど)間、あるいは甲殻類間(ヨコエビ、ミズムシ、ザリガニなど)での濃縮性の類似性や順列の有無明確化

③水生節足動物と陸生節足動物の近縁種間における濃縮性の関連性評価:

水生の昆虫や甲殻類と分類・生態上類似性のある陸生生物との間での濃縮性の類似性や順列の有無明確化、例えば昆虫類では同じ鞘翅目のゲンゴロウとテントウムシや、甲殻類のうち同じ等脚目のミズムシとダンゴムシなど

5.4. 結論

水生生物における化学物質の濃縮性への代謝要因の影響を、幾つかの手法を用いて検討し、生物濃縮性の精緻評価に向けた代謝要因を考慮した簡便手法の有用性を見出した。すなわち、色々な生物種における生物濃縮性の簡便な推測・比較手法として、毒性値および体内致死濃度からの BCF 推算の有効性を見出し、また、濃縮・代謝評価試験における 1 次代謝物の動態に着目した速度論的解析や代謝阻害剤を作用させた状況下での BCF 値変化の解析から、類縁化合物等の生物濃縮性の変動性に大きく関わる代謝速度の明確化や簡便な推算手法の有効性を明らかにできた。更には、そこで得られた代謝速度と簡便な *in vitro* 代謝試験による類縁化合物比較を組み合わせることによって類縁化合物の生物濃縮性の簡便な推測が可能であることを示すことが出来た。これら今回構築した代謝要因を考慮した類縁物質や多様な生物種の生物濃縮性の簡便評価手法は、化学物質審査において、今後益々要求が高まりうる類縁物質や多様な生物群の生物濃縮性の精緻、かつ広範な評価を効率的に行うための有効な簡易手法の 1 つとなると考えられた。

要約

第 1 章の緒論では、環境汚染・生物濃縮性懸念化学物質規制の国際動向、生物濃縮性とその主な支配・影響要因と予測手法、生物多様性と関連した生物濃縮性の多様性などを通じて、各種生物濃縮性評価の簡便法や補足技法の蓄積の必要性を説明し、本論文の目的を明らかにした。

すなわち、過去の生物濃縮性に関連した大規模環境汚染を端緒に環境保護、持続的・安定な地球環境との共生に向けて世界各地において化学物質の危険性を優先して是非判断がなされる時代となっており、事前の様々な安全性関連項目の調査が求められ、その中で生物濃縮性は重要な評価項目の 1 つである。特に EU では微量不純物や環境代謝物までも評価が要求されている。他方、生物濃縮性の支配要因としては化学物質の脂溶性や分子サイズなどあり、様々な予測手法が作成されているものの、その他の生物側の大きな影響要因である化学物質代謝分解能の予測手法への組み込みは不十分である。有機化学物質の多様性などから適用性の幅広い手法の実現には色々な困難・制約があると予想される。更に標準試験生物としては魚が用いられているものの、実環境では種数や多様性から節足動物の評価も重要と考えられる一方で生物多様性に関連し生物濃縮性の予測性や標準試験法作成に多くの課題があり、現状、節足動物での標準試験法確立に向けての明確な取り組みは殆ど見られない。国際的な第一標準である魚の生物濃縮性試験が複雑、高額である点や近年の動物愛護、更に評価対象化学物質が多いことなど踏まえると、代謝要因を踏まえた微量成分・分解物等の類剤の評価や節足動物の多様性も踏まえた簡便評価などの補足技法の充実が望まれる。

本論文ではそれを踏まえて生物濃縮性に影響を及ぼし得る主な課題の 1 つと考えられている代謝要因に関連した簡便手法の構築について検討した。

第 2 章、「生物・代謝多様性を踏まえ、体内致死濃度を活用した節足動物の簡便濃縮性評価手法の検討（殺虫剤ピリダリルのセスジユスリカ、ヨコエビの一種の体内致死濃度を用いた BCF 推算の検討）」では、先ず、殺虫剤ピリダリルのセスジユスリカ幼虫およびヨコエビの一種成体に対する急性毒性および代謝ならびに体内致死濃度 LBR について ^{14}C 標識化合物を用いて調べた。その結果、平均実測水中濃度に基づく急性 LC_{50} 値はそれぞれ 1.1 mg/L（48 時間）、0.015（96 時間）mg/L であった。いずれの種にお

いてもピリダリルの主な代謝様式はジクロロアシルオキシ基のエーテル結合の脱アルキル化および抱合化であった。より高い代謝能がセスジユスリカでは認められ、ピリダリルの体内濃度に基づく LBR は両生物種で同レベルであった事から見かけの毒性は主に代謝能に影響されているものと考えられた。このラボでの急性毒性・代謝試験において得られた毒性値 LC_{50} と体内致死濃度 LBR から生物濃縮係数 $BCF=LBR/LC_{50}$ の関係式に基づいて推算されたセスジユスリカおよび *H. azteca* の BCF はそれぞれ 72、1200 であり 17 倍の違いが認められた。他方、既存のピリダリル野外池試験における水中および各種水生生物中のピリダリル濃度推移データから推算された BCF のうち、水生昆虫のヤゴ、甲殻類のミジンコの値はそれぞれ 180 ± 120 、 3100 ± 2300 であり、ラボでの毒性試験データからの昆虫類（セスジユスリカ）と甲殻類（ヨコエビの一種）での推算値は野外の近縁分類群（昆虫：ヤゴ、甲殻類：ミジンコ類）の値と近似した。このことから、生物間の比較などにおいて毒性値と体内致死濃度からの BCF 推算の活用性が示唆された。また、ラボ標準種、野外生物の何れにおいても BCF の低い生物群では代謝物量の割合が高く、各種無脊椎動物においても代謝が BCF に及ぼす影響の大きいことが示唆された。

第 3 章、「一次代謝物に着目した速度論的解析や *in vitro* 試験活用の類縁体 BCF 簡易評価手法の検討（魚類における *in vivo* および *in vitro* の濃縮性／代謝試験によるピレスロイド系殺虫剤テトラメトリンのトランスおよびシス異性体の生物濃縮性の検討）」では、殺虫剤テトラメトリンの構成成分であるシス、トランス異性体のうち、主成分であるトランス異性体についてブルーギル稚魚における濃縮および代謝、排泄挙動を 2 種類の ^{14}C 標識化合物を用いて、連続流水試験系（設定濃度 1 ppb、28 日曝露/14 日排泄）において評価した。トランステトラメトリンは魚体内でまずエステル開裂を受け、その後、アルコール側、酸側部位とも引き続いて各種代謝を受けた（*N* 脱アルキル化、二重結合の還元、イミノ環開裂、オメガトランスメチル基の酸化、エポキシを経由した水酸化、酸側代謝物のグルクロン酸やタウリン抱合化）。生物濃縮係数 BCF および魚体からの消失半減期はそれぞれ 180-310、0.54-0.72 日であった。加えて、代謝経路を踏まえて濃縮平衡時および排泄期間の一次代謝物の動態に着目し、その生成、消失挙動の速度論的解析から、トランステトラメトリンの代謝、排泄速度をそれぞれ 0.41、0.55 /day と算出し代謝の寄与の大きさを定量的に明らかにした。更に、エス

テラーゼ活性に着目し、魚全身ホモジネートを用いて *in vitro* 分解速度のシス、トランス異性体の比較を行い、それぞれ 1.8、3.7 /day とトランス異性体のより速やかな分解が確認された。トランス異性体の *in vivo* の BCF 値ならびにシスおよびトランス異性体の *in vitro* 分解速度を用いてシス異性体の BCF 値の推算を行い 230-400 と算出された。

第 4 章、「混合物微量分析や代謝阻害剤を活用した濃縮性への代謝要因の明確化簡便法の検討（シス、トランス幾何異性体混合物であるピレスロイド系殺虫剤 *o*-フェノトリンの各異性体の魚濃縮性に及ぼす代謝影響の分別定量分析及び代謝阻害剤を用いた検討）」では、コイ当歳魚をトランス、シス異性体の混合物（4:1）である殺虫剤 *o*-フェノトリンに連続流水下で暴露し各異性体の生物濃縮係数 BCF を検討したところ、トランス体よりもシス体の BCF は 1.1-2.2 倍有意に高値であった。異性体間の物理化学的性質の類似性からこの BCF 値の違いは各異性体の魚における代謝能の違いによると考えられた。更に酸化酵素阻害剤であるピペロニルブトキシサイド共存下で各異性体の BCF を評価したところ、トランス体では阻害剤の有無による顕著な変化は無かったものの、シス体では BCF 値の顕著な上昇が認められた。このことから、シス異性体の酸化代謝の大きさと代謝の BCF への寄与が大きいことがうかがえた。また、この BCF 値の違いから代謝速度と排泄速度の比は最大 2.3-11 倍と見積もられ、代謝分解要因が *o*-フェノトリン幾何異性体の生物濃縮性に大きく寄与していることが示された。加えて、魚体重に基づく取込み速度推算式と代謝阻害時のシス体 BCF から算出された *o*-フェノトリンの取込み、排泄速度はそれぞれ 200 L/kg/day、0.064 /day 推算され、更に、BCF 値からシス体、トランス体の代謝速度はそれぞれ 0.33、0.49 /day と推算された。

第 5 章の「総合考察」では、本研究において検討・構築した代謝要因を考慮した生物濃縮性に関連する評価・解析手法について、生物濃縮性の予測や評価の更なる改良、精緻化や既存手法校正、より正確なパラメータ取得への活用、或いは実際の化合物の評価、特に類縁化合物群の効率的・簡便評価への活用性および本研究の意義について考察、総括した。すなわち、本研究で、色々な生物種における生物濃縮性の簡便な推測・比較手法として、毒性値および体内致死濃度からの BCF 推算の有効性を見出し、また、濃縮・代謝評価試験における 1 次代謝物の動態に着目した速度論的解析や

代謝阻害剤を作用させた状況下での BCF 値変化の解析から、類縁化合物等の生物濃縮性の変動性に大きく関わる代謝速度の明確化や簡便な推算手法の有効性を明らかにできた。更には、そこで得られた代謝速度と簡便な *in vitro* 代謝試験による類縁化合物比較を組み合わせることによって類縁化合物の生物濃縮性の簡便な推測が可能であることを示すことが出来た。これら今回構築した代謝要因を考慮した類縁物質や多様な生物種の生物濃縮性の簡便評価手法は、化学物質審査において、今後益々要求が高まらうる類縁物質や多様な生物群の生物濃縮性の精緻、かつ広範な評価を効率的に行うための有効な簡易手法の 1 つとなると考えられた。

謝辞

本研究をまとめ、論文を執筆するに当たり、ご懇篤なるご指導、ご助言、ご高閲を賜りました広島大学大学院、生物圏科学研究科、水圏生物生産学講座の河合幸一郎教授に、心より厚く御礼申し上げます。

また、審査に当たりの確・親切なご助言、ご高閲を賜りました広島大学大学院、生物圏科学研究科の吉村幸則教授、佐久川弘教授、大塚攻教授、斉藤英俊准教授、ならびに三重大学大学院、生物資源学研究科の古丸明教授に、心より厚く御礼申し上げます。

一方、個々の研究・検討を進めるに当たり、多大なご配慮を賜るとともに様々なご指導、ご助言を下さいました住友化学株式会社、生物環境科学研究所長の片木敏行博士、ならびに生物環境科学研究所、環境科学グループマネージャーの藤澤卓生博士に心より厚く御礼申し上げます。

また、フェノトリンやテトラメトリンに関する研究の実施に当たって様々なご指導、ご助言を下さいました、当時、住友化学工業株式会社、生物環境科学研究所の故 松尾昌季博士、ならびに瀧本善之博士、齋藤昇二博士に心より厚く御礼申し上げます。

更に、テトラメトリンに関する研究の実施において多岐にわたってご協力下さった、当時、住友化学工業株式会社、生物環境科学研究所の田川陽子氏に感謝申し上げます。

引用文献

- Arnot, J. A. and Gobas, F. A. P. C. ; 2006, A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms, *Environmental Reviews*, 14, 257-297.
- Arnot, J. A., Mackay, D. and Bonnell, M. ; 2008, Estimation metabolic biotransformation rates in fish from laboratory data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 341-351.
- ASTM (American Society for Testing and Materials), 1994, Standard Guide for Conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Mollusks, E1022-94.
- ASTM (American Society for Testing and Materials), 1995, Standard Test Methods for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Fresh Water Invertebrates, E1706-95b.
- ASTM (American Society for Testing and Materials), 1996, Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians, E729-96.
- ASTM (American Society for Testing and Materials), 1997, Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates, E1688-97a.
- Barnes, R. S. K., Calow P. and Olive, P. J. W. (eds.); 1988, *The Invertebrates: a new synthesis*, Blackwell Science Publication, Oxford.
- Barron, M. G. ; 1990, Bioconcentration, *Environmental Science & Technology*, 24, 1612-1618.
- Barron, M. G., Charron, K. A., Stott, W. T. and Duval, S. E. ; 1999, Tissue carboxylesterase activity of rainbow trout, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 2506-2511.
- Bintein, S., Devillers, J. and Karcher, W. ; 1993, Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient, SAR and QSAR in *Environmental Research*, 1, 29-39.

- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. ; 1959, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Boxall, A.B.A., Sinclair, C.J., Fenner, K., Kolpin D. and Maund, S.J. ; 2004, When Synthetic Chemicals Degrade in the Environment, *Environmental Science & Technology*, 38, 368A-375A.
- Bradbury, S.P., Dady, J.M., Fitzsimmons, P.N., Voit, M.M., Hammermeister, D.E. and Erickson, R.J. ; 1993, Toxicokinetics and metabolism of aniline and 4-chloroaniline in medaka (*Oryzias latipes*), *Toxicology and Applied Pharmacology*, 118, 205-214.
- Brinkmann, M., Eichbaum, K., Kammann, U., Hudjetz, S., Cofalla, C., Buchinger, S., Reifferscheid, G., Schüttrumpf, H., Preuss, T. and Hollett, H. ; 2014, Physiologically-based toxicokinetic models help identifying the key factors affecting contaminant uptake during flood events, *Aquatic Toxicology*, 152, 38-46.
- Buchwalther, D.B., Jenkins, J.J. and Curtis, L.R. ; 2002, Respiratory strategy is a major determinant of [³H]water and [¹⁴C]chlorpyrifos uptake in aquatic insects, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59, 1315-1322.
- Buchwalther, D.B., Jenkins, J.J. and Curtis, L.R. ; 2003, Temperature influences on water permeability and chlorpyrifos uptake in aquatic insects with differing respiratory strategies, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 2806-2812.
- Burden, N., Creton, S., Weltje, L., Maynard, S.K. and Wheeler, J.R. ; 2014, Reducing the number of fish in bioconcentration studies with general chemicals by reducing the number of test concentrations, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 70, 442-445.
- Butte, W., Fox, K. and Zauke, G.P. ; 1991, Kinetics of bioaccumulation and clearance of isomeric hexachlorocyclohexanes, *The Science of the Total Environment*, 109/110, 377-382.
- Casida, J.E., Engel, J.L., Essac, E.G., Kamienski, F.X., Kuwatsuka, S. ; 1966, Methylene-C¹⁴-dioxyphenyl compounds: Metabolism in relation to their

- synergistic action, *Science*, 153, 1130-1133.
- CEFIC (European Chemical Industry Council), 2014, LRI Toolbox BCF database.
http://cefic-lri.org/lri_toolbox/bcf-database/
- Colborn, T., Dumanoski, D. and Myers, J.P. ; 1996, *Our Stolen Future*, Penguin Books USA Inc., New York.
- Creton, S., Weltje, L., Hobson, H. and Wheeler, J.R. ; 2013, Reducing the number of fish in bioconcentration studies for plant protection products by reducing the number of test concentrations, *Chemosphere*, 90, 1300-1304.
- Cowan-Ellsberry, C.E., Dyer, S.D., Erhardt, S., Bernhard, M.J., Roe, A.L., Dowty, M.E. and Weisbrod, A.V. ; 2008, Approach for extrapolating *in vitro* metabolism data to refine bioconcentration factor estimates, *Chemosphere*, 70, 1804-1817.
- Connell, D.W. ; 1988, Bioaccumulation behavior of persistent organic chemicals with aquatic organisms, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 101, 117-154.
- Connell, D.W. and Hawker, D.W. ; 1988, Use of polynomial expressions to describe the bioconcentration of hydrophobic chemicals by fish, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 16, 242-257.
- Crookes, M. and Brooke, D. ; 2011, Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data, ISBN: 978-1-84911-237-6, Environment Agency (UK).
https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/291527/scho0811buce-e-e.pdf
- DeForest, D.K., Brix, K.V. and Adams, W.J. ; 2007, Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration, *Aquatic Toxicology*, 84, 236-246.
- Deneer, J.W., Budde, B.J. and Weijers, A. ; 1999, Variations in the lethal body burdens of organophosphorus compounds in the guppy, *Chemosphere*, 38, 1671-1683.
- de Wolf, W., de Bruijn, J.H.M., Selnen, W. and Hermens, J.M. ; 1992, Influence

of biotransformation on the relationship between bioconcentration factors and octanol-water partition coefficients, *Environmental Science & Technology*, 26, 1197-1201.

Di Giulio, R. T., Benson, W. H., Sanders B. M. and Van Veld P. A. ; 1995, *Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation, and Toxicity*, In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*, second edition, Edited by Rand, G. M., Taylor & Francis, Washington DC.

Dimitrov, S. D., Dimitrova, N. C., Walker, J. D., Veith, G. D. and Mekenyan, O. G. ; 2003, Bioconcentration potential predictions based on molecular attributes - an early warning approach for chemicals found in humans, birds, fish and wildlife, *QSAR & Combinatorial Science*, 22, 58-67.

Dimitrov, S. D., Dimitrova, N. C., Parkerton, T., Comber, M., Bonnell, M. and Mekenyan, O. G. ; 2005, Base-line model for identifying the bioaccumulation potential of chemicals, *QSAR & Combinatorial Science*, 16, 531-554.

EC (European Commission), 1998, C13 BIOCONCENTRATION: FLOW-THROUGH FISH TEST, In: EC Directive 98/73/EC. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0073&from=en>

EC (European Commission), 2002, Working Document Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology in the context of the Directive 91/414/EEC, Sanco/3268/2001 rev.4 (final). http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/ph_ps/pro/wrkdoc/wrkdoc10_en.pdf

ECETOC (European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals), 2014, Information to be considered in a weight-of-evidence-based PBT/vPvB assessment of chemicals (Annex XIII of REACH), Special Report No. 18. http://www.ecetoc.org/index.php?mact=MCSoap,cntnt01,details,0&cntnt01by_category=4&cntnt01template=display_list_v2&cntnt01order_by=Reference%20desc&cntnt01display_template=display_details_v2&cntnt01document_id=9208&cntnt01returnid=92

ECHA (European Chemicals Agency), 2014, Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment Chapter R. 7c: Endpoint specific guidance, version

- 2.0, November 2014. https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7c_en.pdf
- ECHA (European Chemicals Agency), 2014a, Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment Chapter R.11: PBT/vPvB assessment, version 2.0, November 2014. http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r11_en.pdf
- ECHA (European Chemicals Agency), 2015, Guidance on Biocidal Products Regulation, volume IV Environment - Part B Risk Assessment (active substances), version 1.0, April 2015. http://echa.europa.eu/documents/10162/15623299/bpr_guidance_ra_vol_iv_part_b_en.pdf
- EC JRC (European Commission Joint Research Center) ECVAM, 2014, JRC SCIENCE AND POLICY REPORT: EURL ECVAM Strategy to replace, reduce and refine the use of fish in aquatic toxicity and bioaccumulation testing, ISBN 978-92-79-44557-6 (PDF). <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-strategy-papers/january-2015>
- EFSA (European Food Safety Authority), 2013, Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pyridalyl, EFSA Journal 2013, 11, 3240. http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3240.pdf
- EFSA (European Food Safety Authority), 2013a, Final addendum to the Draft Assessment Report (DAR) - public version- PYRIDALYL, Background document to conclusions. <http://registerofquestions.efsa.europa.eu/roqFrontend/outputLoader?output=QN-3240>
- EU (European Union), 2006, REGULATION (EC) No 1907/2006 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, concerning the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemical Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directive 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC, 18 December 2006.

<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1907-20140410&from=EN>

EU (European Union), 2009, REGULATION (EC) No 1107/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directive 79/117/EEC and 91/414/EEC, 21 October 2009. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1107&from=EN>

EU (European Union), 2014, REGULATION (EC) No 334/2014 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, amending Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, with regard to certain conditions for access to the market, 11 March 2014.

<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0334&from=EN>

Esher, B. I. and Hermens, J. L. M. ; 2002, Modes of action in ecotoxicology: Their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects, *Environmental Science & Technology*, 36, 4201-4217.

Escher, B. I., Ashauer, R., Dyer, S., Hermens, J. L. M., Lee, J. H., Leslie, H. A., Mayer, P., Meador, J. P. and Warne, M. S. J. ; 2010, Crucial role of mechanisms and modes of toxic action for understanding tissue residue toxicity and internal effect concentrations of organic chemicals, *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7, 50-74.

Ewald, G. and Larsson, P. ; 1994, Partitioning of ¹⁴C-labelled 2,2',4,4'-Tetrachlorophenyl between water and fish lipids, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, 1577-1580.

FAMIC (独立行政法人農林水産消費安全技術センター), 2009, ピリダリル農薬抄録. <http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/pyridaly1/index.htm>

Fatima, M., Usmani, N. and Hossain, M. M. ; 2014, Heavy metal in aquatic ecosystem emphasizing its effects on tissue bioaccumulation and histopathology: A review, *Journal of Environmental Science and Technology*, 7, 1-15.

Fay, K. A., Mingoia, R. T., Goeritz, I., Nabb, D. L., Hoffman, A. D., Ferrell, B. D.,

- Peterson, H.M., Nichols, J.W., Segner, H. and Han, X.; 2014, Intra-Interlaboratory reliability of a cryopreserved trout hepatocyte assay for the prediction of chemical bioaccumulation potential, *Environmental Science & Technology*, 48, 8170-8178.
- Fisher, S.W., Hwang, H., Atanasoff, M. and Landrum, P.F.; 1999, Lethal body residues for pentachlorophenol in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) under varying conditions of temperature and pH, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43, 274-283.
- Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S.; 1957, A simple method for the isolation of total lipids from animal tissues, *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Gan, J., Spurlock, F., Hendley, P. and Weston, D.P.; 2008, *Synthetic Pyrethroids: Occurrence and Behavior in Aquatic Environments*, American Chemical Society, Washington DC.
- Garg, R. and Smith, C.J.; 2014, Predicting the bioconcentration factor of highly hydrophobic organic chemicals, *Food and Chemical Toxicology*, 69, 252-259.
- Geyer, H.J., Scheunert, I., Brüggemann, R., Langer, D., Korte, F., Kettrup, A., Mansour, M., Steinberg, C.E.W., Nyholm, N. and Mulr, D.C.G.; 1997, Half-life and bioconcentration of Lindane (γ -HCH) in different fish species and relationship with their lipid content, *Chemosphere*, 35, 343-351.
- Gomez, C.F., Constantine, L. and Huggett, D.B.; 2010, The influence of gill and liver metabolism on the predicted bioconcentration of three pharmaceuticals in fish, *Chemosphere*, 81, 1189-1195.
- Han, X., Nabb, D.L., Mingoia, R.T. and Yang, C.H.; 2007, Determination of xenobiotic intrinsic clearance in freshly isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and rat and its application in bioaccumulation assessment, *Environmental Science & Technology*, 41, 3269-3276.
- 畠山成久, 茂岡忠義 (幹事、日本環境毒性学会 編); 2003, 生態影響試験ハンドブック - 化学物質の環境リスク評価 -, 朝倉書店, 東京.
- 畠山成久 (編著、日本環境毒性学会監修), 2006, 化学物質の生態リスク評価と規制 -

- 農薬編一，株式会社アイピーシー，東京.
- Huckle, K.R. and Millburn, P.; 1990, Metabolism, bioconcentration and toxicity of pesticides in fish, In: Environmental Fate of Pesticides, Edited by Huston, D.H. and Roberts, T.R.; John Wiley & Sons Ltd, New York.
- Hwang, H., Fisher, S.W. and Landrum, P.F.; 2001, Identifying body residues of HCBP associated with 10-d mortality and partial life cycle effects in the midge, *Chironomus riparius*, Aquatic Toxicology, 52, 251-267.
- いであ株式会社，2015，平成 26 年度 化学物質安全対策（金属の生物蓄積性に関する調査）調査報告書，平成 27 年 3 月。 http://www.meti.go.jp/meti_lib/report/2015fy/000116.pdf
- ILSI HESI (International Life Sciences Institute: Health and Environmental Science Institute), 2015, Development of Methods for a Tiered Approach to Assess the Bioaccumulation of Chemicals Technical Committee. <http://www.hesiglobal.org/i4a/pages/index.cfm?pageid=3319>
- Isnard, P. and Lambert, S.; 1988, Estimating bioconcentration factors from octanol-water partition coefficient and aqueous solubility, Chemosphere, 17, 21-34.
- Izumi, T., Kaneko, H., Matsuo, M. and Miyamoto, J.; 1984, Comparative metabolism of the six stereoisomers of phenothrin in rats and mice, Journal of Pesticide Science, 9, 259-267.
- JFE テクノリサーチ株式会社，2015，平成 26 年度経済産業省委託調査報告書：平成 26 年度化学物質安全対策（化学物質リスク評価・管理技術動向調査）報告書，平成 27 年 3 月。 http://www.meti.go.jp/meti_lib/report/2015fy/000381.pdf
- Jonsson, G., Bechmann, R.K., Bamber, S.D. and Baussant, T.; 2004, Bioconcentration, biotransformation, and elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) exposed to contaminated seawater, Environmental Toxicology and Chemistry, 23, 1538-1548.
- Kagan, J., Sinnott, D. and Kagan, E.D.; 1987, The toxicity of pyrene in the fish *Pimephales promelas*: synergism by piperonyl butoxide and by ultraviolet light,

- Chemosphere, 16, 2291-2298.
- 角埜彰, 2010, 化学物質に対する海水魚の感受性とその種間差に関する研究, 水研センター研報, 第33号, 1-70. <https://www.fra.affrc.go.jp/bulletin/bull/bull133/1-70.pdf>
- Kaneko, H., Ohkawa, H. and Miyamoto, J.; 1981, Metabolism of tetramethrin isomers in rats, Journal of Pesticide Science, 6, 425-435.
- Kaneko, H., Izumi, T., Ueda, Y., Matsuo, M. and Miyamoto, J.; 1984, Metabolism and placental transfer of stereoisomers of tetramethrin isomers in pregnant rats, Journal of Pesticide Science, 9, 249-258.
- 環境省非食用農作物専用農薬安全性評価検討会, 2008, 水質汚濁に係る農薬登録保留基準に関する安全性評価及び基準値設定の方針(平成20年2月22日中央環境審議会土壌農薬部会了承). http://www.env.go.jp/water/dojo/noyaku/odaku_kijun/conf_nonfood/index.html
- Kara, A.H. and Hayton, W.L.; 1988, Metabolic inhibition and di-2-ethoxyl phthalate pharmacokinetics in fish, Drug Metabolism and Disposition, 16, 146-149.
- Kara, A.H. and Hayton, W.L.; 1989, A pharmacokinetic analysis of the effect of temperature on the accumulation of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in sheepshead minnow, Aquatic Toxicology, 15, 27-36.
- Katagi, T.; 1993, Hydrolysis of *trans*-tetramethrin in buffered aqueous solutions, Journal of Pesticide Science, 18, 343-351.
- Katagi, T.; 2010, Bioconcentration, Bioaccumulation, and Metabolism of Pesticides in Aquatic Organisms, In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 204, 1-132. https://www.researchgate.net/publication/40444316_Bioconcentration_Bioaccumulation_and_Metabolism_of_Pesticides_in_Aquatic_Organisms
- Katagi, T.; 2012, Environmental behavior of synthetic pyrethroids, In: Pyrethroids From Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide, Topics in Current Chemistry, 314, 167-202.
- 加藤隆一, 鎌滝哲也; 2000, 薬物代謝学(第2版) —医療薬学・毒性学の基礎として

一，株式会社 東京化学同人，東京.

- Kato, T., Ueda, K. and Fujimoto, K.; 1964, New insecticidally active chrysanthemates, agricultural and biological chemistry, 28, 914-915.
- Kenneth, W. and Willem, S.; 2010, Acute toxicity and lethal body burden of endosulfan in tilapia (*Oreochromis niloticus* (L)), The Open Environmental Pollution & Toxicology Journal, 2, 21-26.
- Kleinow, K.M., Nichols, J.W., Hayton, W.L., McKim, J.M. and Barron, M.G.; 2008, Toxicokinetics in Fishes, In: The Toxicology of Fishes, Edited by Di Giulio, R.T. and Hinton, D.E., Taylor & Francis Group.
- Kodaka, R., Sugano, T., Tsuzuki, M., Katagi, T. and Takimoto, Y.; 2004, Aerobic aquatic soil metabolism of pesticides in water- and sediment-spiked systems, Journal of Pesticide Science, 29, 332-338.
- 厚生労働省, 2008, サリドマイド製薬の薬事分科会における審議結果等について, 平成 20 年 10 月 3 日. <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/10/h1003-4.html>
- 厚生労働省医薬/生活衛生局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長, 2015, 魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験, 「新規化学物質等に係る試験の方法について」の一部改正について, 薬生発 1221 第 1 号・20151209 製局第 1 号・環企発第 1512211 号, 平成 27 年 12 月 21 日. http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/about/laws/laws_h230402-3_151221.pdf
- 厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室・経済産業省製造産業局化学物質管理課化学物質安全室・環境省総合環境政策局環境保健部企画課化学物質審査室, 2011, 新規化学物質の判定および監視化学物質への該当性の判定等に係る試験方法及び判定基準, 平成 23 年 4 月 22 日. http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/information/ra/criteria_110422.pdf
- Laskowski, D.A.; 2002, Physical and chemical properties of pyrethroids, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 174, 49-170.
- Leahey, J.P.; 1985, The Pyrethroid Insecticides, Taylor & Francis, London & Philadelphia.
- Lech, J.J. and Bend, J.R.; 1980, Relationship between biotransformation and the

- toxicity and fate of xenobiotic chemicals in fish, *Environmental Health Perspectives*, 34, 115-131.
- Lech, J.J. and Vodcnik, M.J. ; 1985, Biotransformation, In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, Edited by Rand, G.M. and Petrocelli, S.R. ; Hemisphere Publishing Corp., Washington DC.
- Lee, Y.S., Lee, D.H.Y., Delapoulhouze, M., Otton, S.V., Moore, M.M., Kennedy, C.J. and Gobas, F.A.P.C ; 2014, *In vitro* biotransformation rates in fish liver S9: Effect of dosing techniques, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33, 1885-1893.
- Liu, F., Wiseman, S., Wan, Y., Doering, J.A., Hecker, M., Lam, M.H.W. and Giesy, J.P. ; 2012, Multi-species comparison of the mechanism of biotransformation of MeO-BDEs to OH-BDEs in fish, *Aquatic Toxicology*, 114-115, 182-188.
- Liu, N., Dong, F., Xu, J., Liu, X. and Zheng, Y. ; 2016, Chiral bioaccumulation behavior of tebuconazole in the zebrafish (*Danio rerio*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, 78-84.
- Lotufo, G.R. ; 1998, Lethal and sublethal toxicity of sediment-associated fluoranthene to benthic copepods: application of the critical-body-residue approach, *Aquatic Toxicology*, 44, 17-30.
- Lu, P., Metcalf, R.L., Plummer, N. and Mandel, D. ; 1977, The environmental fate of three carcinogens: Benzo(a)pyrene, benzidine, and vinyl chloride evaluated in laboratory model ecosystems, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 6, 129-142.
- 松尾昌季, 宮本純之 ; 1980, 水圏における化学物質の生物濃縮メカニズム, *生態化学*, 3, 21-38.
- Mäenpää, K. and Kukkonen, J.V.K. ; 2006, Bioaccumulation and toxicity of 4-nonylphenol (4-NP) and 4-(2-dodecyl)-benzene sulfonate (LAS) in *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Insecta), *Aquatic Toxicology*, 77, 329-338.
- Maund, S.J. ; Campbell, P.J., Giddings, J.M., Hamer, M.J., Henry, K., Pilling, E.D., Warinton, J.S. and Wheeler, J. R. ; 2012, *Ecotoxicology of Synthetic*

- Pyrethroids, In: Pyrethroids From Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide, Topics in Current Chemistry, 314, 137-165.
- McCarty, L. S. ; 1986, The relationship between aquatic toxicity QSARs and bioconcentration for some organic chemicals, Environmental Toxicology and Chemistry, 5, 1071-1986.
- McCarty, L. S. ; 1987, Relationship between toxicity and bioconcentration for some organic chemicals. I. examination of the relationship, In: QSAR in Environmental Toxicology-II, Edited by Kaiser, K. L. E. ; D. Reidel Publishing Company, Dordrecht.
- McCarty, L. S., Mackey, D., Smith, A. D., Ozburn, G. W. and Dixon, D. G. ; 1992, Residue-based interpretation of toxicity and bioconcentration QSARs from aquatic bioassays: neutral narcotic organics, Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 917-930.
- McCarty, L. S. and Mackey, D. ; 1993, Enhancing ecotoxicological modeling and assessment, Environmental Science & Technology, 27, 1719-1728.
- McElroy, A. E., Barron, M. G., Beckvar, N., Driscoll, K. S. B., Meador, J. P., Parkerton, T. F., Preuss, T. G. and Steevens, J. A. ; 2010, A review of the tissue residue approach for organic and organometallic compounds in aquatic organisms, Integrated Environmental Assessment and Management, 7, 50-74.
- Melancon, M. J., Saybolt, J. and Lech, J. J. ; 1977, Effect of piperonyl butoxide on disposition of di-2-ethylhexyl phthalate by rainbow trout, Xenobiotica, 7, 633-640.
- Meylan, W. M., Howard, P. H., Boethling, R. S., Aronson, D., Printup, H. and Gouchie, S. ; 1999, Improved method for estimating bioconcentration/bioaccumulation factor from octanol/water partition coefficient, Environmental Toxicology and Chemistry, 18, 664-672.
- Mikata, K., Isobe, N. and Kaneko, H. ; 2012, Biotransformation and Enzymatic Reactions of Synthetic Pyrethroids in Mammals, In: Pyrethroids From Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide, Topics in Current Chemistry, 314, 113-135.

- Miranda, C.L., Henderson, M.C. and Buhler, D.R.; 1998, Evaluation of chemicals as inhibitors of trout Cytochrome P450s, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 148, 237-244.
- Miyamoto, J., Sato, Y., Yamamoto, K., Endo, M. and Suzuki, S.; 1968, Biochemical studies on the mode of action of pyrethroidal insecticides: Part I. metabolic fate of phthalthrin in mammals, *Agricultural and Biological Chemistry*, 32, 628-640.
- Miyamoto, J., Mikami, N. and Takimoto, Y.; 1990, The fate of pesticides in aquatic ecosystems, In: *Environmental Fate of Pesticides*, Edited by Huston, D.H. and Roberts, T.R.; John Wiley & Sons Ltd, New York.
- 宮本貢, 田中仁詞, 片木敏行; 2008, 農薬の水圏生態系における影響評価について, 住友化学, 2008-I, 26-40. http://www.sumitomo-chem.co.jp/rd/report/theses/docs/20080102_v5j.pdf
- Miyamoto, M., Saito, S., Takimoto, Y. and Matsuo, M.; 1992, Effect of metabolism on bioconcentration of geometric isomers of *d*-phenothrin in fish, *Chemosphere*, 24, 2001-2007.
- Miyamoto, M. and Katagi, T.; 2010, Acute toxicity and related metabolism of pyridalyl in *Chironomus yoshimatsui* and *Hyalella azteca*, *Journal of Pesticide Science*, 35, 441-446.
- Miyamoto, M., Fujiwara, A., Tanaka, H. and Katagi, T.; 2013, Acute aquatic toxicity of metofluthrin metabolites in the environment, *Journal of Pesticide Science*, 38, 173-180.
- Miyamoto, M., Saito, S., Fujisawa, T. and Katagi, T.; 2015, Bioconcentration and metabolism of *trans*-tetramethrin in fish, *Journal of Pesticide Science*, 40, 130-137.
- Muir, D.C.G., Hobden, B.R. and Servos, M.R.; 1994, Bioconcentration of pyrethroid insecticides and DDT by rainbow trout: uptake, depuration, and effect of dissolved organic carbon, *Aquatic Toxicology*, 29, 223-240.
- 仲井俊司, 高野光太郎, 齋藤昇二; 2006, 改正化審法における濃縮性予測手法活用, 住友化学, 2006-I, 44-51. <http://www.sumitomo-chem.co.jp/rd/report/>

- theses/docs/20060106_vpv.pdf*
- 中西準子, 堀口文男; 2006, 詳細リスク評価書シリーズ8 トリブチルスズ, 丸善株式会社, 東京.
- Nichols, J.W., Schultz, I.R. and Fitzsimmons, P.N.; 2006, *In vitro-in vivo* quantitative extrapolation of hepatic metabolism data for fish: A review of methods and strategies for incorporating intrinsic clearance estimates into chemical kinetic models, *Aquatic Toxicology*, 78, 74-90.
- Nichols, J.W., Bonnell, M., Dimitrov, S.D., Escher, B., Han, X. and Kramert, N. I.; 2009, Bioaccumulation assessment using predictive approach, *Integrated Environmental Assessment and Technology*, 5, 577-597.
- Nichols, J.W., Huggett, D.B., Arnot, J.A., Fitzsimmons, P.N. and Cowan-Ellsberry, C.E.; 2013, Toward improved models for predicting bioconcentration of well-metabolized compounds by rainbow trout using measured rates of *in vitro* intrinsic clearance, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32, 1611-1622.
- Nichols, J., Gobas, F., MacLeod, M., Borgå, K., Leonards, P., Papa, E., Laue, H. and Arnot, J.; 2015, Summary of Cefic-LRI Sponsored Workshop: Recent Scientific Developments in Bioaccumulation Research, February 23, 2015.
http://cefic-lri.org/wp-content/uploads/2014/03/HelsinkiWorkshop_Cefic-LRI_FinalReport.pdf
- 西原力, 斉藤昇二, 松尾昌季; 1993, 化学物質の生物濃縮機構とその構造活性相関, *衛生化学*, 39, 494-508.
- NITE (独立行政法人製品評価技術基盤機構), 2009, カテゴリーアプローチによる化学物質の生物濃縮性予測に関する検討結果の公表について.
http://www.nite.go.jp/chem/qsar/category_approach.html
- NITE (独立行政法人 製品評価技術基盤機構) 化学物質管理センター, 2009a, カテゴリーアプローチによる生物濃縮性予測に関する報告書[単純受動拡散カテゴリー], 平成21年10月20日. *<http://www.nite.go.jp/data/000009561.pdf>*
- NITE (独立行政法人 製品評価技術基盤機構) 化学物質管理センター, 2012, カテゴリーアプローチによる生物濃縮性予測に関する報告書[生体内での代謝によって排出され易く生体内に濃縮されにくいことが知られている化学物質群], 平成24年

- 7月6日. <http://www.nite.go.jp/data/000009565.pdf>
- 農林水産省農産園芸局長通知, 2014, 農薬の登録申請に係る試験成績について12農産
第8147号 一部改正26 消安第532号. [http://www.acis.famic.go.jp/shinsei/
8147/8147.pdf](http://www.acis.famic.go.jp/shinsei/8147/8147.pdf)
- OECD, 1981, テストガイドライン, 第3章 305 生物濃縮, 1981年5月12日採択.
- OECD, 1992, OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS, 203 Fish, Acute Toxicity
Test, Adopted: 17 July 2004. [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/
test-no-203-fish-acute-toxicity-test_9789264069961-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-203-fish-acute-toxicity-test_9789264069961-en)
- OECD, 1996, OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS, 305 Bioaccumulation:
Flow-through fish test, Adopted: 14 June 1996.
- OECD, 2004, OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS, 218 Sediment-Water
Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment, Adopted: 13 April 2004.
[http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-218-sediment-water-chir
onomid-toxicity-using-spiked-sediment_9789264070264-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-218-sediment-water-chironomid-toxicity-using-spiked-sediment_9789264070264-en)
- OECD, 2008, OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS, 315 Bioaccumulation in
Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, Adopted: 3 October 2008.
[http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-315-bioaccumulation-in-
sediment-dwelling-benthic-oligochaetes_9789264067516-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-315-bioaccumulation-in-sediment-dwelling-benthic-oligochaetes_9789264067516-en)
- OECD, 2010, OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS, 317 Bioaccumulation in
Terrestrial Oligochaetes, Adopted: 22 July 2010.
[http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-317-bioaccumulation-in-
terrestrial-oligochaetes_9789264090934-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-317-bioaccumulation-in-terrestrial-oligochaetes_9789264090934-en)
- OECD, 2012, OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS, 305 Bioaccumulation in
Fish: Aqueous and Dietary Exposures, Adopted: 2 October 2012.
[http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-305-bioaccumulation-in-
fish-aqueous-and-dietary-exposure_9789264185296-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-305-bioaccumulation-in-fish-aqueous-and-dietary-exposure_9789264185296-en)
- OECD, 2012a, OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS, 211 *Daphnia magna*
Reproduction Test, Adopted: 2 October 2012. [http://www.oecd-ilibrary.org/
environment/test-no-211-daphnia-magna-reproduction-test_9789264185203-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-211-daphnia-magna-reproduction-test_9789264185203-en)
- OECD, 2015, Work plan for the Test Guidelines Programme (TGP), 1st July 2015.

http://www.oecd.org/env/ehs/testing/TGP%20work%20plan_declassification_July%202015.pdf

- Ohshima, M., Yoshida, S., Saito, S., Mikami, N. and Matsuo, M.; 1992, Taurine conjugation of the ester metabolite of prallethrin in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, Journal of Pesticide Science, 17, 283-285.
- Opperhuizen, A. and Sum, D.T.H.M.; 1990, Bioaccumulation and biotransformation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxines and dibenzofurans in fish, Environmental Toxicology and Chemistry, 9, 175-186.
- Pathiratne, A. and George, S.G.; 1998, Toxicity of malathion to nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and modulation by other environmental contaminants, Aquatic Toxicology, 43, 261-271.
- Rand, G.M., Wells, P.G. and McCarty, L.S.; 1995, Introduction to Aquatic Toxicology, In: Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment, second edition, Edited by Rand, G.M., Taylor & Francis, Washington DC.
- Roberts, T.R., Hutson, D., Lee, P. W., Nicholls, P. H. and Plimmer, J. R.; 1999, Metabolic Pathways of Agrochemicals Part II: Insecticides and Fungicides, The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- 斉藤昇二, 1992, Σi および Σo を用いた魚介類における化学物質の生物濃縮性記述手法に関する研究 (学位論文) .
- Saito, S., Tanoue, A. and Matsuo, M.; 1991, The i/o-characters to describe bioconcentration of organic chemicals in fish, Chemosphere, 23(6), 789-799.
- Saito, S., Tanoue, A. and Matsuo, M.; 1992, Applicability of the i/o-characters to a quantitative description of bioconcentration of organic chemicals in fish, Chemosphere, 24, 81-87.
- 坂本典保, 植田展仁, 梅田公利, 松尾三四郎, 葉賀徹, 藤澤卓生, 富ヶ原祥隆; 2005, 新規殺虫剤ピリダリルの発明と開発, 住友化学, 2005-I, 33-44.
- http://www.sumitomo-chem.co.jp/rd/report/theses/docs/20050103_p01.pdf
- Sakamoto, N., Saito, S., Hirose, T., Suzuki, M., Matsuo, S., Izumi, K., Nagatomi, T., Ikegami, H., Umeda, K., Tsushima, K. and Matsuo, N.; 2003, The discovery

- of pyridalyl: a novel insecticidal agent for controlling lepidopterous pests, *Pest Management Science*, 60, 25-34.
- Sakuratani, Y., Noguchi, Y., Kobayashi, K., Yamada, J. and Nishihara, T.; 2008, Molecular size as a limiting characteristic for bioconcentration in fish, *Journal of Environmental Biology*, 29, 89-92.
- 里見至弘, 清水誠; 1992, 有機スズ汚染と水生生物影響, 水産学シリーズ [92], 恒星社厚生閣, 東京.
- Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E.P., George, S., James, M., Kullman, S.W., van den Hurk, P. and Willett, K.; 2008, Biotransformation in Fishes, In: *The Toxicology of Fishes*, Edited by Di Giulio, R.T. and Hinton, D.E., Taylor & Francis Group.
- Schlts, I.R. and Hayton, W.L.; 1994, Body size and the toxicokinetics of trifluralin in rainbow trout, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 129, 138-145.
- Schlts, I.R. and Hayton, W.L.; 1999, Interspecies scaling of the bioaccumulation of lipophilic xenobiotics in fish: an example using triflurarin, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 1440-1449.
- Schuler, L.J., Landrum, P.F., Harwood, A.D., Tripp, E.M. and Lydy, M.J.; 2009, Joint toxicity of fluoranthene and pentachlorobenzene to *Hyalella azteca* and *Chironomus dilutes*, *Chemosphere*, 77, 399-403.
- SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry), 2015, Global Advisory Groups: Bioaccumulation Science. <http://www.setac.org/members/group.aspx?id=90694&hhSearchTerms=%2522Bioaccumulation+and+science%2522>
- Sijm, D.T.H.M., Schaap, G. and Opperhuizen, A.; 1993, The effect of the biotransformation inhibitor piperonylbutoxide on the biotransformation of 2,8-dichlorodibenzo-*p*-dioxin and pentachlorobenzen in goldfish, *Aquatic Toxicology*, 27, 345-360.
- Sijm, D.T.H., Verberne, M., De Jonge, W.J., Pärt, P. and Opperhuizen, A.; 1995, Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 131, 130-135.

- Silver, I.S. and Dauterman, W.C. ; 1989, The pharmacokinetics and metabolism of (1*R*, *cis*)- and (1*R*, *trans*)-tetramethrin in rats, *Xenobiotica*, 19, 301-314.
- Silver, I.S. and Dauterman, W.C. ; 1989a, The toxicokinetics of (1*R*, *cis*)- and (1*R*, *trans*)-tetramethrin in the isolated perfused rat liver, *Xenobiotica*, 19, 509-519.
- Smith, I.H. and Casida, J.E. ; 1981, Epoxychrysanthemic acid as an intermediate in metabolic decarboxylation of chrysanthemate insecticides, *Tetrahedron Letters*, 22, 203-206.
- Spacie, A., McCarty, L.S. and Rand, G.M. ; 1995, Bioaccumulation and Bioavailability in Multiphase Systems, In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*, second edition, Edited by Rand, G.M. ; Taylor & Francis, Washington DC.
- Stehly, G.R. and Hayton, W.L. ; 1989, Disposition of pentachlorophenol in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): effect of inhibition of metabolism, *Aquatic Toxicology*, 14, 131-148.
- Suzuki, T., and Miyamoto, J. ; 1974, Metabolism of tetramethrin in houseflies and rats *in vitro*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 4, 86-97.
- Takimoto, Y., Ohshima, M., Matsuda, T. and Miyamoto, J. ; 1986, Abstracts: The sixth international congress of pesticide chemistry, 7B-04, IUPAC August 10-15th, Ottawa.
- Tierney, K.B., Kennedy, C.J., Gobas, F., Gledhill, M. and Sekela, M. ; 2014, Organic Contaminants and Fish, In: *Organic Chemical Toxicology of Fishes*, Edited by Tierney, K.B., Farrell, A.P. and Brauner, C.J. ; Elsevier, London.
- Tomigahara, Y., Mori, M., Shiba, K., Isobe, N., Kaneko, H., Nakatsuka, I. and Yamada, H. ; 1994, Metabolism of tetramethrin isomers in rat. I. Identification of a sulphonic acid type of conjugate and reduced metabolites, *Xenobiotica*, 24, 473-484.
- Tomigahara, Y., Mori, M., Shiba, K., Isobe, N., Kaneko, H., Nakatsuka, I. and Yamada, H. ; 1994a, Metabolism of tetramethrin isomers in rat: II. Identification and quantitation of metabolites., *Xenobiotica*, 24, 1205-1214.

- Treu, G., Drost, W., Jöhncke, U., Rauert, C. and Schlechtriem, C.; 2015, The Dessau Workshop on bioaccumulation: state of the art, challenges and regulatory implications, Environmental Sciences Europe, 27:34, 1-7.
- 通商産業省, 2000, 日本工業規格 JIS Z7260-305:2000, 生物濃縮(水からの直接濃縮): 魚類を用いる連続流水試験方法, 官報公示:平成 12. 2. 21.
- UN (United Nations), 2001, STOCKHOLM CONVENTION ON PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS, 2004 年 5 月発効. <http://www.env.go.jp/chemi/pops/>
- US EPA (Environmental Protection Agency), 1982, Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate, EPA540/9-82-021, October 18, 1982.
- US EPA (Environmental Protection Agency), 1996, Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.1730 Fish BCF “Public Draft”, EPA712-C-96-129, April 1996. <http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/850-1730.pdf>
- US EPA (Environmental Protection Agency), 1996a, Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.1710 Oyster BCF “Public Draft”, EPA712-C-96-127, April 1996. <http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/850-1710.pdf>
- US EPA (Environmental Protection Agency), 1996b, Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.1735 Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates, Freshwater “Public Draft”, EPA712-C-96-354, April 1996. <http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/850-1735.pdf>
- US EPA (Environmental Protection Agency), 1999, Category for Persistent, Bioaccumulative, and Toxic New Chemical Substances, OPPTS-53171A; FRL-6097-7. <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-1999-11-04/pdf/99-28888.pdf>
- US EPA (Environmental Protection Agency), 2000, Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates Second Edition, EPA600/R-99/064, March 2000. <http://archive.epa.gov/water/archive/polwaste/web.old/pdf/freshmanual.pdf>
- US EPA (Environmental Protection Agency), 2006, Reregistration Eligibility

- Decision for Piperonyl Butoxide (PBO), June 2006, EPA 738-R-06-005.
http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-067501_14-Jun-06.pdf
- US EPA (Environmental Protection Agency), 2008, Pesticide Fact Sheet: Pyridalyl, April 24 2008, EPA 738-R-06-005. *http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-295149_24-Apr-08.pdf*
- US EPA (Environmental Protection Agency), 2010, Reregistration Eligibility Decision (RED) Document for Tetramethrin, Revised April 2010, EPA 738-R-08-012. *<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDS/tetramethrin-revised-red.pdf>*
- US EPA (Environmental Protection Agency), 2010a, TSCA NEW CHEMICALS PROGRAM (NCP) CHEMICAL CATEGORIES, Last revised August 2010. *http://www.epa.gov/sites/production/files/2014-10/documents/ncp_chemical_categories_august_2010_version_0.pdf*
- US EPA (Environmental Protection Agency), 2012, EPI Suite™-Estimation Program Interface, version 4.11 (November, 2012). *<http://www.epa.gov/tsca-screening-tools/epi-suitetm-estimation-program-interface>*
- US EPA (Environmental Protection Agency), 2015, ECOTOX Database.
<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>
- US EPA (Environmental Protection Agency) Mid-Continent Ecology Division, 2015, Fathead Minnow. *http://archive.epa.gov/med/med_archive_03/web/html/fathead_minnow.html*
- van Wezel, A. P., de Vries, D. A. M., Kostense, S., Sijm, D. T. H. M. and Opperhuizen, A. ; 1995, Intraspecies variation in lethal body burdens of narcotic compounds, *Aquatic Toxicology*, 33, 325-342.
- Veith, G. D., DeFoe, D.L. and Bergstedt, B.V. ; 1979, Measuring and estimating the bioconcentration factor of chemicals in fish, *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 36, 1040-1048.
- von der Ohe, P.C. and Liess, M. ; 2004, Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds, *Environmental*

- Toxicology and Chemistry, 23, 150-156.
- 若林明子, 2000, 化学物質と生態毒性, 社団法人 産業環境管理協会, 東京.
- Weinstein, J.E. and Garner, T.R.; 2008, Piperonyl butoxide enhances the bioconcentration and photoinduced toxicity of fluoranthene and benzo[*a*]pyrene to larvae of the grass shrimp (*Palaemonetes pugio*), Aquatic Toxicology, 87, 28-36.
- Weisbrod, A.V., Sahi, J., Segner, H., James, M.O., Nichols, J., Schultz, I., Erhardt, S., Cowan-Ellsberry, C., Bonnell, M. and Hoeger, B.; 2009, The state of *in vitro* science for use in bioaccumulation assessment for fish, Environmental Toxicology and Chemistry, 28, 86-96.
- Weisbrod, A.V., Burkhard, L.P., Arnot, J., Mekenyan, O., Howard, P.H., Russom, C., Boethling, R., Sakuratani, Y., Traas, T., Bridges, T., Lutz, C., Bonnell, M., Woodburn, K. and Parkerton, T.; 2007, Workgroup report: Review of fish bioaccumulation databases used to identify persistent, bioaccumulative, toxic substances, Environ Health Perspectives, 115, 255-261.
- Wilcoxon, S.E., Meier, P.G. and Landrum, P.F.; 2003, The toxicity of fluoranthene to *Hyalella azteca* in sediment and water-only exposures under varying light spectra, Ecotoxicology and Environmental Safety, 54, 105-117.
- WHO (World Health Organization), 1989, INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 83: DDT AND ITS DERIVATIVES - ENVIRONMENTAL ASPECTS. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc83.htm>
- WHO (World Health Organization), 1989a, INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 86: MERCURY - ENVIRONMENTAL ASPECTS. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc086.htm>
- WHO (World Health Organization), 1990, INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 98: TETRAMETHRIN. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc98.htm>
- WHO (World Health Organization), 1990a, INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 116: TRIBUTYL TIN COMPOUNDS. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc116.htm>

WHO (World Health Organization), 1992, INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 140: POLYCHLORINATED BIPHENYLS AND TERPHENYLS (SECOND EDITION). <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc140.htm>

山県登; 1978, 生物濃縮 - 環境科学特論 -, 産業図書株式会社, 東京.

Yamato, Y., Kiyonaga, M. and Watanabe, T.; 1983, Comparative bioaccumulation and elimination of HCH isomers in short-necked clam (*Venerupis japonica*) and guppy (*Poecillia reticulata*), Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 31, 352-359.

谷津直秀, 内田亨; 1972, 動物分類名辞典, 株式会社 中山書店, 東京.

湯嶋健, 桐谷圭治, 金沢純; 1973, 生態系と農薬, 岩波書店, 東京.

以上