石油系炭化水素を対象とした発光バクテリアを用いた 簡易土壌汚染評価手法の開発 3 ーアルカン構造異性体に関する急性毒性評価ー*

杉田 創**・駒井 武***

Development of simplified soil pollution evaluation method using luminous bacteria for petroleum hydrocarbons 3 -Acute toxicity evaluation of alkane structural isomers-*

Hajime SUGITA** and Takeshi KOMAI***

Abstract

For the purpose of developing a simplified soil pollution evaluation method using luminous bacteria for petroleum hydrocarbons, in the previous study, the acute toxic effects of n-alkanes which are the main components of gasoline were evaluated. On the other hand, many petroleum hydrocarbon products such as gasoline also contain many branched alkanes. In this study, to investigate the differences in toxic effects due to differences in molecular structure, acute toxicity tests using luminescent bacteria was conducted with structural isomers of chain alkanes (2 types of pentane and 5 types of hexane) and a cyclic alkane (cyclohexane). The alkane structural isomers dissolved in methanol were used as test solutions. Then magnitude relationship of the acute toxicity were 2-methylbutane < n-pentane < 2,2-dimethylbutane < Cyclohexane < 3-methylpentane $\leq$ 2,3-dimethylbutane $\leq$ 2-methylpentane < n-hexane, based on the estimated value of the alkane concentration at which the relative luminescence intensity ratio at the reaction time of 60 minutes becomes 50%. Comparison of the test results for the structural isomers indicated that the acute toxicity of the straight chain alkanes is higher than that of the branched chain ones. In addition, this study suggested that the acute toxicity might increase with increasing number of carbon atom in the straight chain.

Key Words: Soil Pollution Evaluation Method, Luminous Bacteria, Structural Isomer, Pentane, Hexane, Acute Toxicity Evaluation

* 資源・素材学会平成20年度（2008年）春季大会にて一部発表（2008年3月27日）
第17回環境化学討論会にて一部発表（2008年6月12日）

資源・素材2008（仙台）にて一部発表（2008年10月8日）

** 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 地質調査総合センター 地圏資源環境研究部門（〒305-8567 茨城県つくば市東1-1-1 産総研 第七事業所）

Institute for Geo-Resources and Environment, Geological Survey of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

*** 東北大学大学院 環境科学研究科（〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-20）

Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University

要 旨

石油系炭化水素を対象とした発光バクテリアを用いた簡易土壌汚染評価手法の開発を目的として、既往の研究においてガソリン等の主要な構成成分である *n*-アルカンの急性毒性影響が調べられた。しかしながら、ガソリン等多くの石油系炭化水素製品には分岐アルカンも多く含まれている。本研究では、試験対象物質としてアルカン構造異性体であるペンタンの構造異性体2種類及びヘキサンの構造異性体5種類に加えて環状アルカンであるシクロヘキサンを用い、分子構造による発光バクテリアに及ぼす急性毒性影響の差異の有無を調べた。メタノールに溶解したアルカン構造異性体を検液とした試験における急性毒性影響の強さは、反応時間60分での相対発光強度比が50%となるアルカン濃度の推測値を基準にすると、2-メチルブタン<*n*-ペンタン<2,2-ジメチルブタン<シクロヘキサン<3-メチルペンタン $\leq$ 2,3-ジメチルブタン $\leq$ 2-メチルペンタン<*n*-ヘキサンであった。構造異性体間の試験結果の比較から、分岐アルカンよりも直鎖アルカンの方が発光バクテリアに対して強い急性毒性影響を持つと評価された。加えて、直鎖部分の炭素数が多い物質ほど急性毒性影響が強いことが示唆された。

キーワード：土壌汚染評価手法、発光バクテリア、構造異性体、ペンタン、ヘキサン、急性毒性評価

1. はじめに

ガソリンをはじめとした石油系炭化水素の利用に伴う大気・水質・土壌等の環境汚染や生態毒性影響等については、前報(杉田・駒井, 2020)において、多くの文献(Swack et al., 2014; Claxton, 2014 a; 2014b; 2015a; 2015b; 2015c; 斎藤ほか, 1972; 斎藤・高桑, 1974; McKee and Plutnick, 1989; Turner and Renegar, 2017; 環境省, 2006; 土壌環境センター, 2009など)を引用して概説した。加えて、日本国内におけるメダカやミジンコ等微小生物を使用したバイオアッセイによる急性毒性及び慢性毒性等の評価手法についても代表的な研究例(国立環境研究所, 1995; 1999; 市川ほか, 1997; 鈴木ほか, 1998; 庄司ほか, 2000a; 2000b; 2003; 長島ほか, 2001; 金ほか, 2002; 尾崎ほか, 2003; 土壌環境センター, 2009など)を紹介した。

急性毒性評価や汚染物質の簡易検出技術として期待されている発光バクテリアを用いたバイオアッセイ手法については、Microtox®の商標で商品化され、欧米では広く研究に用いられており(McFeters et al., 1983; Codina et al., 1994; McCloskey et al., 1996; Gellert, 2000; Mowat and Bundy, 2002; Hsieh et al., 2004; Fulladosa et al., 2005), 2000年代後半に国際標準化機構(International Organization for Standardization, ISO)において規格化されている(ISO 11348-1, 2007; 11348-2, 2007; 11348-3, 2007; 21338,

2010)。また、ISOで規格化される以前から日本国内においても多くの研究が実施されてきた(国立環境研究所, 1998; 2001; 2006; 山川ほか, 1998; 北橋, 1997; 1999; 笹島ほか, 2005; 豊本ほか, 2006; 荒川ほか, 2007など)。

前例でも挙げられているようにバイオアッセイによる急性毒性評価は、水生生物を用いて実施されてきた経緯から、地下水や河川水等の水質汚染評価に適用されてきた。一方、土壌を汚染した物質は、徐々に地下水へ移行し、地下水の流れに沿って汚染範囲を広げていくと一般的に考えられている。それは、疎水性物質である油類や水への溶解度が低い重金属類でさえ同様であり、それゆえ、土壌汚染のリスク評価は、地下水汚染のリスク評価にも密接につながっている。著者らは、発光バクテリアを用いた簡易土壌汚染評価手法の確立を目指して、土壌汚染対策法の第二種特定有害物質やメッキ金属を含む重金属類、ナノ粒子を対象として発光バクテリアによる急性毒性評価試験を実施し、その結果を報告してきた(杉田ほか, 2013; 2016; 杉田・駒井, 2018)。また、ガソリンや軽油など石油系炭化水素及びその単成分である *n*-ペンタンから *n*-ドデカンまでのメタン系炭化水素(アルカン類)に着目して、発光バクテリアを用いたアルカン単成分ごとの急性毒性評価試験を行ない、アルカンの炭素数の差異による発光バクテリアに及ぼす影響を定量的に評価した(杉田ほか, 2010; 杉田・駒井, 2020)。杉田・駒井(2020)では、特にメタノールを溶媒としてアル

カン類を溶解させた溶液を検液として用いて発光バクテリアに及ぼす急性毒性影響が調べられ、炭素数が高いアルカンほど、また濃度が高いほど相対発光強度比が一定値になるまでに要する時間が長くなること、アルカンの種類に拘わらず、アルカン濃度が高いほど相対発光強度比は低くなることを報告した。加えて、相対発光強度比に及ぼすアルカン濃度の影響は、アルカンの炭素数が低いほど強くなる傾向を見出し、このことから、炭素数が高いアルカンほど発光バクテリアに及ぼす急性毒性影響に関する反応速度が低くなると推察された。さらに、アルカンに関する急性毒性評価を行う場合、反応時間30分よりも60分のデータを使用することを提案した。この既往の研究(杉田・駒井, 2020)では、試験物質として直鎖アルカン(*n*-アルカン)が用いられたが、実際の石油系炭化水素製品中には分岐アルカンも多く含まれている。例えば、三木ほか(1997)は、石炭液化ナフサと直留系ガソリンの組成について報告しており、全直鎖アルカン(注意:本引用文献中ではアルカンをパラフィンと記載している)と全分岐アルカンの含有量は、粗ナフサではそれぞれ21.45 wt%と9.484 wt%であり直鎖アルカンの方が高いが、市販のレギュラーガソリンでは、それぞれ6.628 wt%と50.656 wt%であり分岐アルカンの方が高いとしている。互いに構造異性体の関係にある直鎖アルカンと分岐アルカンは、化学組成が同じ物質であっても分子構造の差異によって生態への毒性影響が異なることが予想される。

そこで、本研究では、構造異性体間での発光バクテリアに及ぼす急性毒性影響の差異の有無を調べるために、アルカン構造異性体であるペンタン及びヘキサンの構造異性体を試験対象物質として比較試験を実施した。加えて、シクロヘキサンについても同様の試験を実施した。これは、鎖状化合物であるアルカン類と環状化合物であるシクロアルカンの一種であるシクロヘキサンの試験結果を比較することで、分子構造による急性毒性影響の差異をより明確にすることができると考えたからである。加えて、ガソリン等のように多種類の石油系炭化水素から成る物質は、環境中で時間経過に伴い組成が変化する可能性が高く、特に高分子量(高炭素数)の物質が分解され、低分子量(低

炭素数)の物質に変化していくことが容易に予想される。そのため、ガソリン等それら自体のみではなく、それらに含まれる単成分ごとのリスク評価(急性毒性評価)を行うべきである。これまでの一連の研究により、直鎖アルカン、分岐アルカン及び環状アルカンの急性毒性の強さの比較が可能となり、石油系炭化水素による土壤汚染評価において最も影響力の高い成分が明らかになることが期待される。

2. 実験方法

本研究で使用した発光バクテリア及び試験方法は、ガソリン等石油系炭化水素を対象として実施された急性毒性評価試験について報告した杉田ほか(2010)及び杉田・駒井(2020)とほぼ同様であり、ここではその概略のみを記す。

2.1 発光バクテリア

本研究に用いた発光バクテリアの種類は、*Aliivibrio fischeri* (旧名 *Vibrio fischeri*) であり、既往の研究(杉田ほか, 2010など)と同様に、日立化成株式会社(現昭和電工マテリアルズ株式会社)から提供を受けたものである。この発光バクテリアは50 mlのプラスチック容器に約1 g(塩溶液を含む)が冷凍保存されたもので、約0.4 mol/LのNaCl溶液を約50 ml添加し解凍することにより、再活性化させた。

2.2 検液の調製

本研究では、入手可能であったペンタンの構造異性体2種類(*n*-ペンタン、2-メチルブタン)、ヘキサンの構造異性体5種類(*n*-ヘキサン、2-メチルペンタン、3-メチルペンタン、2,2-ジメチルブタン、2,3-ジメチルブタン)及びシクロアルカン1種類(シクロヘキサン)を用いた。これらは全て富士フィルム和光純薬株式会社(旧和光純薬工業株式会社)から購入したものである。なお、以降では前出の順に、1-Pen、2-Pen、1-Hex、2-Hex、3-Hex、4-Hex、5-Hex及びcy-Hexと略記で示す。表1に系統名・慣用名、分子式、示性式、略記をまとめて記す。名称は基本的には系統名で示しており、慣用名を括弧内に記した。な

お、ペンタンの構造異性体には、上記の2種類以外にも2,2-ジメチルプロパン（ネオペンタン）が存在するが、沸点が10℃未満で室温では気体であるため、本試験の対象としなかった。

検液の作製方法は既往の研究と同様に溶媒としてメタノール（99.9%, Fisher Scientific）を用い、アルカンの濃度を0.001～1 vol%の範囲で所定の濃度に調整したものを検液とした。加えて、溶媒に溶解させない、アルカン濃度100 vol%の検液も試験対象とした。

2.3 発光強度の測定方法

本研究における発光バクテリアによる急性毒性試験の手順は、既往の研究と同様であるが、参考のため、杉田・駒井（2020）から引用した文章を以下に掲載した。

本試験で使用したルミノメーター（RT01, 日立化成株式会社（現昭和電工マテリアルズ株式会社））は24試料を同時測定可能である。検液を添加しない場合、発光バクテリアの発光強度は、測定環境温度に依存するが、室温（20～25℃）では概ね再活性化後約30分から120分程度安定して高い値を維持した。そこで、再活性化後の発光バクテリア溶液をそれぞれのセルに所定量（2 ml）取り、再活性化後約45～60分後に発光強度を測定して初期値とした。次に、それぞれのセルに検液を所定

量（50μl）添加し、パラフィルム（PARAFILM®）を圧着させてセル上面を覆い、直ちに発光強度を連続測定して経時変化を記録した。なお、この測定開始時刻を反応開始時間と見なすこととする。また、同一検液を三つのセルに添加し、その平均値をデータ解析に使用した。

なお、発光強度の測定値の取り扱い及び測定誤差については、杉田・駒井（2020）において詳細に検証されているため、そちらをご参照いただきたい。

2.4 急性毒性の評価方法

各検液の急性毒性の強さの評価方法についても既往の研究と同様である。以下に杉田・駒井（2020）から引用した文章を掲載した。

アルカン類に関する試験では、メタノールにアルカンを溶解したものを検液としているため、メタノールをブランクとした。ただし、メタノールに溶かさず、アルカン試薬をそのまま検液とした試験については、イオン交換水をブランクとして用いた。

ブランクを加えたセルの発光バクテリアのある時間での発光強度 I_{Blank} をそのセルの発光強度の初期値 I_{Blank0} で割った値 ($I_{\text{Blank}}/I_{\text{Blank0}}$) を基準として、検液を加えたセルの発光バクテリアのある時間での発光強度 I_x をそのセルの発光強度の初期値 I_{x0} で割った値 (I_x/I_{x0}) を相対評価することに

表1 本研究で試験されたアルカン構造異性体及びシクロヘキサン

Table 1 Alkane structural isomers and cyclohexane tested in this study.

構造異性体の種類等	系統名(慣用名)	分子式	示性式等	略号
ペンタンの構造異性体	ペンタン (n-ペンタン)	C_5H_{12}	$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$	1-Pen
	2-メチルブタン (イソペンタン)		$CH_3-*CH(CH_3)-CH_2-CH_3$	2-Pen
ヘキサンの構造異性体	ヘキサン (n-ヘキサン)	C_6H_{14}	$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$	1-Hex
	2-メチルペンタン (イソヘキサン)		$CH_3-*CH(CH_3)-CH_2-CH_2-CH_3$	2-Hex
	3-メチルペンタン		$CH_3-CH_2-*CH(CH_3)-CH_2-CH_3$	3-Hex
	2,2-ジメチルブタン (ネオヘキサン)		$CH_3-*C(CH_3)_2-CH_2-CH_3$	4-Hex
	2,3-ジメチルブタン (ジイソプロピル)		$CH_3-*CH(CH_3)-*CH(CH_3)-CH_3$	5-Hex
シクロアルカン	シクロヘキサン	C_6H_{12}		cy-Hex

示性式中の「*C」は分岐を持つ炭素原子を意味する。

よって、その物質Xの急性毒性を評価する。つまり、式(1)で表される発光バクテリアの相対発光強度比 S [%] の値を急性毒性評価の指標とする。

$$S = (I_X/I_{X0})/(I_{Blank}/I_{Blank0}) \times 100 \quad (1)$$

したがって、 S の値が低いほど発光バクテリアの活性が低下していることを意味し、つまり毒性影響が強いことを意味している。

また、既往の研究(杉田・駒井, 2020)によって本手法による S の平均値と最大値並びに最小値を基にして求めた最大測定誤差は4%以内であることが検証されている。したがって、 S の値が初期値(通常100%)から4%以上低い値(つまり、96%以下)を取った場合に“発光バクテリアに対して急性毒性影響を及ぼすことが確認された”と判断した。なお、反応時間 $t = X \text{ min}$ における S の値を $S_{t(X)}$ と表記する。

3. 急性毒性試験結果

3.1 アルカン構造異性体100 vol%の急性毒性評価

図1にメタノール溶媒なしでアルカン構造異性体を直接的に発光バクテリアに添加した試験の結果の一部を示す。

図1(a)及び(b)はそれぞれペンタン及びヘキサン(シクロヘキサン)の構造異性体に関する試験結果を示している。なお、cy-Hexは、ヘキサンの構造異性体ではないが、炭素数6という共通因子を持つため、図1(b)に併記している。これらの図はイオン交換水を検液として添加した発光バクテリアの発光強度をブランクとして相対発光強度比 S [%] を求め、経時変化を示したものである。また、発光強度の測定値は1分間隔で記録されているが、図を見やすくするために、15分間隔のデータのみをプロットしている。また、急性毒性影響の有無の判断基準は、2.4節に記述した通り、96%よりも低い値を取るかどうかとし、本章では、 $t = 60 \text{ min}$ における S の値 $S_{t(60)}$ を判断する基準値として使用する。

ペンタンの構造異性体に関しては、図1(a)から、発光バクテリアに対して2-Penは急性毒性影響をほぼ及ぼさない($S_{t(60)} = 98.6\%$)が、1-Penは極めて弱い急性毒性影響を及ぼしている($S_{t(60)} = 94.4\%$)。ヘキサンの構造異性体に関しては、図1(b)から、発光バクテリアに対して1-Hex及び2-Hexは急性毒性影響をほとんど及ぼさないが、他の3種類のヘキサンの構造異性体(3-Hex, 4-Hex及び5-Hex)及びcy-Hexは急性毒性影響を及ぼしていることがわかる。各100 vol%の検液での急性毒性影響の強さは、1-Hex $\approx$

図1 各アルカン構造異性体100 vol%を検体としたときの発光バクテリアの相対発光強度比の経時変化
(a) ペンタンの構造異性体, (b) ヘキサンの構造異性体及びシクロヘキサン
* ブランクはイオン交換水である。

Fig. 1 Change of relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria with time for 100 vol% of each alkane structural isomer.

(a) Structural isomers of pentane, (b) Structural isomers of hexane and cyclohexane

2-Hex<4-Hex≡5-Hex<3-Hex<cy-Hexであり、環状化合物であるcy-Hexが他の鎖状化合物であるヘキサンの構造異性体よりも強い急性毒性影響を及ぼすことが明らかになった。なお、本研究で試験されたアルカン類全体としては、1-Pen≡1-Hex≡2-Hex<2-Pen<4-Hex≡5-Hex<3-Hex<cy-Hexである。

以上から、化学組成が同じアルカンであっても分子構造が異なる構造異性体では、発光バクテリアに及ぼす急性毒性影響の強さが異なることが明らかになった。

3.2 メタノール溶媒下でのペンタンの構造異性体の急性毒性評価

メタノールに溶かしたペンタンの構造異性体を発光バクテリアに添加した試験結果の一部を図2に示す。なお、図2(a)及び(b)はそれぞれ1-Pen及び2-Penに関する試験結果を示している。また、1-Penに関するデータは杉田・駒井(2020)において取得されたデータを使用している。凡例のアルカン濃度は検液中の濃度である。加えて、本研究で実施したペンタンの構造異性体に関する試験で得られた $t=60$ minにおける S の値 $S_{t(60)}$ を全て表2に示す。

表2から、1-Penに関しては0.01 vol%で急性毒性影響が認められる($S_{t(60)}=92.6\%$)が、0.08

表2 ペンタンの構造異性体に関する試験で得られた $S_{t(60)}$

Table 2 $S_{t(60)}$ obtained in tests with structural isomers of pentane.

C [vol%]	$S_{t(60)}$ [%]	
	1-Pen	2-Pen
0.001	96.1	88.7
0.01	92.6	90.2
0.02	92.7	87.7
0.04	97.3	92.0
0.06	94.9	89.3
0.08	99.2	94.1
0.1	96.0	85.9
0.2	83.9	80.8
0.3	67.0	-
0.4	-	74.3
0.5	40.1	-
0.6	24.6	48.0
0.8	20.2	37.7
1.0	18.8	23.7
100	94.4	98.6

*1-Penの0.001～1.0 vol%に関するデータは杉田・駒井(2020)において取得されたものである。

図2 メタノール溶媒に溶解したペンタンの構造異性体に関する発光バクテリアの相対発光強度比の経時変化。

(a) n-ペンタン, (b) 2-メチルブタン

* ブランクの検液はメタノール 100 vol%である。

** 1-Penに関するデータは杉田・駒井(2020)において取得されたものである。

Fig. 2 Change of relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria with time for structural isomers of pentane dissolved in methanol.

(a) n-Pentane and (b) 2-Methylbutane

vol%では急性毒性影響は認められない ($S_{t(60)} = 99.2\%$)。0.1～1 vol%では明確に急性毒性影響が認められ、全体的にはアルカン濃度が高いほど $S_{t(60)}$ の値が低くなることから、濃度依存性があることがわかる (図2(a) 及び表2)。2-Pen に関しては0.001 vol%以上で明確に急性毒性影響が認められ、0.1～1 vol%では、明らかにアルカン濃度が高いほど $S_{t(60)}$ の値が低くなり、濃度依存性が認められる (図2(b) 及び表2)。

3.3 メタノール溶媒下でのヘキサンの構造異性体の急性毒性評価

メタノールに溶かしたヘキサンの構造異性体及びシクロヘキサンを発光バクテリアに添加した試験結果の一部を図3に示す。なお、図3(a) から (f) はそれぞれ1-Hex, 2-Hex, 3-Hex, 4-Hex, 5-Hex 及び cy-Hex に関する試験結果を示している。また、本研究で実施したヘキサンの構造異性体及びシクロヘキサンに関する試験で得られた $S_{t(60)}$ を全て表3に示す。

2-Hex, 4-Hex 及び cy-Hex は0.001～1 vol%で、1-Hex は0.002～1 vol%で、3-Hex 及び5-Hex は0.01～1 vol%で急性毒性影響が認められ、濃度依存性があることもわかる (表3)。なお、5-Hex は、低濃度 (0.001 vol%) において発光バクテリアに対して活性化作用を及ぼしている ($S_{t(60)} > 104\%$) と思われる (表3)。

4. 考察

4.1 発光バクテリアに及ぼすアルカン構造異性体の急性毒性影響とオクタノール-水分配係数の相関性

本研究で対象としたアルカン構造異性体に関する物性値データや生態毒性情報については、国際労働機関 (International Labour Organization, ILO) が提供している国際化学物質安全性カード (International Chemical Safety Cards, ICSCs) やアメリカ国立医学図書館 (National Library of Medicine, NLM) の化学物質データベース ChemIDplus (NLM, 閲覧2020.2.13) で入手可能である (一部を除く)。オクタノール-水分配係数 $\log Pow$ 及び水溶性 (水への溶解度) に関する

データを抜粋したものを CAS 登録番号とともに表4に示す。なお、CAS 登録番号 (CAS registry number: CAS RN®) とは、化学物質を特定するための番号であり、アメリカ化学会 (American Chemical Society, ACS) の情報部門である CAS (Chemical Abstracts Service) によって付与・管理されている化合物を識別するための番号である (化学情報協会, 2017, 閲覧2020.2.13)。また、溶解度データは参照元では単位が統一されていなかったため、比較が容易なように、表4には「mg/L」を基準として換算した数値を記載している。ただし、1-Pen に関しては、ICSC の値は有効数字に起因する誤解を防ぐために参照元と同じ「g/L」で表記している (0.04 g/L=40 mg/L ではないため)。なお、本研究で試験したアルカン構造異性体のデータが全て揃っているため、基本的には ChemIDplus が提供しているデータを以降では使用した。

一般的には、炭化水素のオクタノール/水分配係数 ($\log Pow$) は炭素数の増加に伴い増加し、また、オクタノール/水分配係数が高いほど生態への毒性が強いと言われている。本研究で得られた各アルカン構造異性体の $S_{t(60)}$ の値を $\log Pow$ に対してプロットしたものを図4に示す。この図から明らかなように、アルカン構造異性体に関しては $\log Pow$ と $S_{t(60)}$ の間に相関関係は認められない。

次に、図4と同様に、各 $S_{t(60)}$ の値を対応するそれぞれの水への溶解度に対してプロットしたものを図5に示す。前図同様にこの図においても特筆すべき傾向は認められない。なお、構造異性体の分子量は同じであるため、質量濃度をモル濃度に換算してプロットしても同様の結果である。

以上から、ペンタン及びヘキサンの構造異性体については、 $\log Pow$ 及び溶解度の観点から毒性の強さを結びつけることは困難であると思われる。ただし、メタノール等の溶媒を伴わない場合、アルカンの水への溶解度が極めて低いため、検液が発光バクテリア溶液に完全には溶解しなかった可能性がある。つまり、添加したアルカンの量に対して、発光バクテリアに影響を及ぼすことができる実質的なアルカンの割合が小さかったために、添加されたアルカン量に対応する本来の

図3 メタノール溶媒に溶かしたヘキサン、シクロヘキサンの構造異性体及びシクロヘキサンに関する発光バクテリアの相対発光強度比の経時変化。

(a) n-ヘキサン, (b) 2-メチルペンタン, (c) 3-メチルペンタン, (d) 2, 2-ジメチルブタン, (e) 2, 3-ジメチルブタン, (f) シクロヘキサン。

* ブランクの検液はメタノール 100 vol%である。

** 1-Hex に関するデータは杉田・駒井 (2020) において取得されたものである。

Fig. 3 Change of relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria with time for structural isomers of hexane and cyclohexane dissolved in methanol.

(a) n-Hexane, (b) 2-Methylpentane, (c) 3-Methylpentane, (d) 2,2-Dimethylbutane, (e) 2,3-Dimethylbutane, (f) Cyclohexane.

表3 ヘキサンの構造異性体及びシクロヘキサンに関する試験で得られた $S_{t(60)}$ Table 3 $S_{t(60)}$ obtained in tests with structural isomers of hexane and cyclohexane.

C [vol%]	$S_{t(60)}$ [%]					
	1-Hex	2-Hex	3-Hex	4-Hex	5-Hex	cy-Hex
0.001	96.6	95.3	96.5	94.4	105.7	91.7
0.002	94.2	-	-	-	-	-
0.005	93.1	-	-	-	-	-
0.01	89.6	92.0	93.3	85.1	90.7	90.3
0.02	86.6	89.0	85.0	83.8	85.2	84.5
0.04	-	88.1	82.4	81.7	80.0	78.9
0.05	70.9	-	-	-	-	-
0.06	-	74.6	74.1	72.8	74.6	72.1
0.08	-	69.7	74.0	65.7	69.8	73.2
0.1	33.6	56.5	59.7	64.3	59.7	62.5
0.2	17.8	29.0	27.7	51.1	28.8	38.1
0.4	-	18.2	11.1	19.1	13.6	11.2
0.5	12.1	-	-	-	-	-
0.6	-	15.7	17.1	10.9	12.7	11.6
0.8	-	11.1	12.8	12.8	14.9	10.9
1.0	11.8	15.3	19.1	11.1	11.2	10.1
100	97.0	102.0	78.0	85.0	85.0	45.0

*1-Hex の0.001～1.0 vol%に関するデータは杉田・駒井 (2020) において取得されたものである。

表4 本研究で試験された物質のオクタノール-水分配比及び水溶性

Table 4 Octanol-water partition coefficient and water solubility of materials tested in this study.

			log P_{OW}		水溶性 (溶解度)	
略号	物質名	CAS RN®	ICSC	ChemIDplus	ICSC	ChemIDplus
1-Pen	n-ペンタン	109-66-0	3.39	3.39	0.04 g/L (20°C)	38 mg/L (25°C)
2-Pen	2-メチルブタン	78-78-4	2.3	2.72	不溶	48 mg/L (25°C)
1-Hex	n-ヘキサン	110-54-3	3.9	3.9	13 mg/L (20°C)	9.5 mg/L (25°C)
2-Hex	2-メチルペンタン	107-83-5	3.2	3.21	不溶	14 mg/L (25°C)
3-Hex	3-メチルペンタン	96-14-0	3.6	3.6	不溶	17.9 mg/L (25°C)
4-Hex	2,2-ジメチルブタン	75-83-2	-	3.82	-	18.4 mg/L (25°C)
5-Hex	2,3-ジメチルブタン	79-29-8	-	3.42	-	22.5 mg/L (25°C)
cy-Hex	シクロヘキサン	110-82-7	3.4	3.44	58 mg/L (25°C)	55 mg/L (25°C)

急性毒性影響が反映されなかった可能性もある。

4.2 相対発光強度比 - 濃度相関式

ペンタン及びヘキサン構造異性体に関する $S_{t(60)}$ を各アルカン濃度 C [vol%] に対して両対数プロットしたものを図6に示す。図6(a)には、 $C=0.01\sim1$ vol%の範囲で取得した全てのデータがプロットされている。アルカンの種類によって範囲が異なるが、相対的に C が低い範囲では $S_{t(60)}$ の値が100%に近い値を維持し、ある濃度を

超えると直線的に低下している。さらに、相対的に C が高い範囲 ($=S_{t(60)}$ の値が低いとき) でも直線傾向から外れるプロットがある。図6(b)には、データプロットを結んで得られた近似曲線の相関係数が0.990以上となる範囲のデータを抽出したものを示している。既往の研究(杉田・駒井, 2020)においては、 $S_{t(60)}$ とアルカン濃度の間に、式(2)で示される良好な相関関係が認められた。

$$\log S_{t(60)} = \log \gamma + \varepsilon \log C \quad (2)$$

図4 オクタノール - 水分分配係数に対する各アルカン構造異性体 100 vol% を検体としたときの反応時間 60 分における発光バクテリアの相対発光強度比のプロット

Fig. 4 Plot of relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria at $t=60$ min for 100 vol% of each alkane structural isomer against octanol-water partition coefficient.

図5 水への溶解度に対する各アルカン構造異性体 100 vol% を検体としたときの反応時間 60 分における発光バクテリアの相対発光強度比のプロット

Fig. 5 Plot of relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria at $t=60$ min for 100 vol% of each alkane structural isomer against solubility in water.

図6 発光バクテリアの相対発光強度比とアルカン濃度の間にべき乗関係のあるデータのプロット

(a) 0.01～1 vol%の範囲の全データプロット, (b) 相関係数 0.990 以上のデータプロット

Fig. 6 Plot of data with power relation between relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria and concentration of alkane. (a) All data plots in the range of 0.01 to 1 vol%, (b) Data plots with correlation coefficient of more than 0.990

ここで、 γ 及び ε は式(2)に実測データを適用させることによって得られるパラメータ値である。本研究においても式(2)を用い、得られたパラメータ γ 、 ε の値及び相関係数 R を表5に示す。また、それぞれに適用したデータの各濃度範囲も併記した。さらに、式(2)及びパラメータ γ 及び ε を用いて求めた $S_{t(60)}$ の値が100%及び50%になる検液中の各アルカン濃度 $C_{S(100)}$ 及び $C_{S(50)}$ [vol%] の値を表5に追記した。

式(2)から求められる $C_{S(100)}$ は、仮想的なものではあるが、本法における各対象物資の毒性が検出される限界濃度の目安になるもので、この値が低いほど検出性が高いことを意味する。しかしながら、式(2)から得られた $C_{S(100)}$ は表5に示されている適用範囲外の値であり実際の値と一致しない可能性が高く、実際に、本試験において実測された $S_{t(60)}$ が明らかに100%を下回るときの C の値は、表5の $C_{S(100)}$ の値よりも低いことは表2及び3に記載されているデータと比較すれば明らかである。

一方、本研究で得られた $C_{S(50)}$ に関しては、 $C_{S(100)}$ の場合とは異なり、全て表5に示されている適用範囲内の値であるため、信頼性が高いと考えられる。毒性を評価する指標として、 EC_{50}

(Median effect concentration) や LC_{50} (Median lethal concentration) が一般に使用されているが、 $C_{S(50)}$ もそれらに類似した指標となるものであり、この値が低いほど毒性が高いことを意味している(杉田ほか, 2010)。 $C_{S(50)}$ を基準として毒性の強さを比較すると、ペンタン及びヘキサンの構造異性体の両者ともに分岐型よりも直鎖型の $C_{S(50)}$ が低く、つまり毒性が高いと評価される。

4.3 炭素数及び分子構造による急性毒性影響の差異

メタノール溶媒に溶かした検液を用いた試験で得られた急性毒性影響の強さは、 $C_{S(50)}$ を基準とすると、 $2\text{-Pen} < 1\text{-Pen}$ 及び $4\text{-Hex} < 3\text{-Hex} \leq 5\text{-Hex} \leq 2\text{-Hex} < 1\text{-Hex}$ である。基本的なことであるが、炭素Cの直鎖部分は、1-Penは五つ、2-Penは四つである。同様に、1-Hexは六つ、2-Hex及び3-Hexは五つ、4-Hex及び5-Hexは四つである。つまり、直鎖部分の炭素数で比較すると、 $2\text{-Pen} < 1\text{-Pen}$ 及び $4\text{-Hex} = 5\text{-Hex} < 3\text{-Hex} = 2\text{-Hex} < 1\text{-Hex}$ である。したがって、直鎖部分の炭素の数と急性毒性影響の強さの大小関係がおおよそ一致している。このことから、同種の構造異性体間では、炭素の直鎖部分が長い物質、つまり直鎖部分の炭素

表5 式(2)中の各パラメータに関するデータ及び $C_{S(100)}$ 及び $C_{S(50)}$ の計算値
Table 5 Data on parameters in equation (2) and calculated values of $C_{S(100)}$ and $C_{S(50)}$.

試料名	適用範囲 [vol%]	$\log S_{t(60)} = \log \gamma + \varepsilon \log C$			$C_{S(100)}$ [vol%]	$C_{S(50)}$ [vol%]
		γ	ε	R		
1-Pen	0.2～1.0	19.6	-0.924	0.997	0.171	0.363
2-Pen	0.4～1.0	25.9	-1.187	0.992	0.320	0.574
1-Hex	0.05～0.5	6.9	-0.764	0.998	0.030	0.075
2-Hex	0.06～0.8	9.7	-0.747	0.991	0.044	0.111
3-Hex	0.08～0.4	3.9	-1.180	0.998	0.064	0.115
4-Hex	0.2～0.6	5.3	-1.404	1.000	0.124	0.203
5-Hex	0.08～0.4	5.4	-1.030	0.997	0.059	0.115
cy-Hex	0.08～0.2	12.1	-0.712	1.000	0.052	0.137

* 1-Pen 及び 1-Hex に関するデータは杉田・駒井 (2020) において報告されたものである。

数が多い物質ほど急性毒性影響が強いことが推測される。なお、環状構造を持つ **cy-Hex** の $C_{S(50)}$ の値は、**4-Hex** よりも低い、他の鎖状型のヘキサンの構造異性体よりも高い。したがって、同じ炭素数6の試験物質を比較すると、**4-Hex** を除けばヘキサンの構造異性体の方が **cy-Hex** よりも発光バクテリアに対して強い急性毒性影響を持つと評価される。

また、炭素骨格の分岐位置によっても急性毒性影響の強さが異なることが予想されるが、**2-Hex** と **3-Hex** の急性毒性影響の強さに顕著な差異が認められないことから、分岐点の一つの場合、分岐位置によって急性毒性影響に大きな差異を生じないと考えられる。一方、**5-Hex** の方が **4-Hex** よりも急性毒性影響が強いことから、一つの炭素が二つの分岐を持つよりも、二つの炭素が各一つの分岐を持つ方が強い急性毒性影響を持つと考えられる。加えて、**5-Hex** と **2-Hex** 及び **3-Hex** の急性毒性影響の強さにも顕著な差異が認められないことから、分岐を持つ炭素の数が多くとも、各炭素の分岐数が1の場合は、分岐数による急性毒性影響の強さに大きな差異は生じないことも推測される。

しかしながら、上述した推測の多くに関しては、本試験結果のみでは試験対象物質が少ないために断定はできない。そのため、さらなる多くの構造異性体を対象とした研究が必要である。なお、100 vol% のヘキサンの構造異性体を検液とした試験の結果は、上記の推測に合致しない。これは、ヘキサンの構造異性体は水への溶解度が低く、発光バクテリアへの影響が限定的であったためと考えられる。

5. まとめ

分岐アルカンは直鎖アルカン同様に石油等に含まれる炭化水素であり、多数の構造異性体が存在するが、化学組成が同じ物質であっても分子構造が異なれば毒性の強さも異なることが予想される。そこで、本研究では、アルカン構造異性体である2種類のペンタン及び5種類のヘキサン、加えて環状物質のシクロヘキサンを試験対象物質として、分子構造による発光バクテリアに及ぼす急

急性毒性影響の差異の有無を調べた。

100 vol% のアルカン構造異性体を検液とした試験における急性毒性影響の強さは、**1-Pen**, **1-Hex**, **2-Hex** < **2-Pen** < **4-Hex**, **5-Hex** < **3-Hex** < **cy-Hex** であった。しかしながら、これらアルカン類は、水への溶解度が極めて低いために、発光バクテリアへの影響が限定的であったと考えられる。

一方、メタノールに溶解したアルカン構造異性体を検液とした試験では、 $C_{S(50)}$ を基準とすると、**2-Pen** < **1-Pen** < **4-Hex** < **cy-Hex** < **3-Hex** ≤ **5-Hex** ≤ **2-Hex** < **1-Hex** であった。本研究で試験されたアルカン構造異性体に関しては、メタノールを溶媒とした試験結果から、分岐型よりも直鎖型の方が発光バクテリアに対して強い急性毒性影響を持つと評価された。加えて、直鎖部分の炭素数が多い物質ほど急性毒性影響が強いことが示唆された。

杉田・駒井 (2020) では、 $C_{S(50)}$ を基準とすると、炭素数5から12までの直鎖アルカンの中で炭素数8のオクタン (**n**-オクタン) が最も強い急性毒性影響 ($C_{S(50)} = 0.015\%$) を持つことが示された。前述したように、同じ炭素数を持つ分岐アルカンや環状アルカンよりも直鎖アルカンの急性毒性影響が強いと考えられることから、分岐及び環状を含む炭素数5～12のアルカン類の中では、**n**-オクタンの急性毒性影響が最も強いと考えられる。一方、杉田・駒井 (2020) では、ガソリンの急性毒性影響の強さ ($C_{S(50)} = 0.063\%$) は、**n**-オクタンよりも **n**-ヘプタン ($C_{S(50)} = 0.075\%$) に近いことが示された。この結果から、ガソリン等複数の成分から成る物質の急性毒性影響の強さは、急性毒性影響の最も強い成分を反映するのではなく、物質を構成する成分の組成比に依存することが推測される。それゆえ、今後、組成比と各単成分の急性毒性影響の強さを考慮した換算式等の評価法の構築が期待される。

他方、アルカン類は、土壌あるいは地下水中で化学的あるいは生物学的作用を受けて自然分解していく過程でアルコール類を生じる可能性があることが指摘されている (飯塚, 1971; Grund et al., 1975; 村上ほか, 1976; 村上・長沢, 1978; 田中・福井, 1980; 村上ほか, 1985; 小林, 1994)。それゆえ、今後の直近の課題として、ア

ルコール類についてもアルカン類同様に構造異性体間で急性毒性影響に差異があるかを確認することが挙げられる。

謝 辞

本研究にあたり、試料及び試験装置のご提供並びに適切なお助言をいただきました日立化成株式会社（現昭和電工マテリアルズ株式会社）の皆様には、たいへんお世話になりました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- 荒川 豊・野々村誠・栗田恵子・杉森博和 (2007)：海洋性発光バクテリアを用いた簡易毒性試験方法. 東京都立産業技術研究センター研究報告, 2, 110-111.
- 飯塚 広 (1971)：微生物による炭化水素の酸化－とくに脂肪族について－. 有機合成化学, 29 (8), 779-787.
- 市川和洋・鄭 然孫・内海英雄 (1997)：個体毒性の検証に基づく *in vitro* 簡易毒性評価系の確立. 水環境学会誌, 20, 701-704.
- 一般社団法人土壌環境センター (2009)：平成20年度環境省請負業務成果報告書, 平成20年度土壌汚染による生態系生活環境への影響及び油汚染による土壌汚染と調査業務報告書.
- 尾崎夏栄・柏田祥策・毛利紫乃・山田正人・鑑迫典久・安原昭夫・小野芳朗 (2003)：ヒメダカ (*Oryzias latipes*) を用いたバイオアッセイによる埋立処分場浸出水の有害性評価. 水環境学会誌, 26, 751-756.
- 化学情報協会 (2017)：CAS RN® 正しく活用するためには?, <https://www.jaici.or.jp/casproducts/rn/casrn2017.pdf>. (2020.2.6閲覧)
- 環境省 (2006)：油汚染対策ガイドライン－鉱油類を含む土壌に起因する油臭・油膜問題への土地所有者等による対応の考え方－. <http://www.env.go.jp/water/dojo/oil/full.pdf>. (2020.2.13閲覧)
- 北橋伸一 (1997)：マイクロトックスによる最終処分場浸出水の毒性評価. 千葉県廃棄物情報技術センター年報, 4, 99-103.
- 北橋伸一 (1999)：マイクロトックスによる最終処分場浸出水の毒性評価 (2). 千葉県廃棄物情報技術センター年報, 6, 61-64.
- 金 範洙・酒井康行・迫田章義 (2002)：水処理プロセスの改善に向けたバイオアッセイの利用. 生産研究, 54, 55-61.
- 国立環境研究所 (1995)：水環境における化学物質の長期暴露による相乗的生態系影響に関する研究. 国立環境研究所特別研究報告書, SR-19-95.
- 国立環境研究所 (1998)：環境中の有機塩素化合物の暴露と複合健康影響に関する研究. 国立環境研究所特別研究報告書, SR-25-98.
- 国立環境研究所 (1999)：化学物質の生態影響評価のためのバイオモニタリング手法の開発に関する研究. 国立環境研究所特別研究報告書, SR-29-99.
- 国立環境研究所 (2001)：環境中の化学物質総リスク評価のための毒性試験系の開発に関する研究. 国立環境研究所特別研究報告書, SR-41-2001.
- 国立環境研究所 (2006)：化学物質環境リスクに関する調査・研究. 国立環境研究所特別研究報告書, SR-76-2006.
- 小林規矩夫 (1994)：土壌および地下水中の灯油に及ぼす揮散と微生物分解の影響. 山梨衛公研報, 38, 65-69.
- 斎藤和雄・稲井弘子・高桑栄松 (1972)：ガソリンの毒性に関する研究 第1報 市販無縁および加鉛ガソリン投与ラットの脳波学的変化ならびに臓器中鉛量. 産業医学, 14 (1), 9-20.
- 斎藤和雄・高桑栄松 (1974)：ガソリンの毒性に関する研究 第2報 加鉛および有機溶剤混入ガソリンについて. 産業医学, 16, 3-10.
- 笹島武司・川崎清人・土原義弘・森 友子・楠井隆史・佐伯真由美・橋本隆司 (2005)：産業廃棄物最終処分場浸出水のバイオアッセイに関する研究 (第1報). 平成17年度富山県環境科学センター年報, 33, 49-58.
- 庄司 良・酒井康行・迫田章義・鈴木基之 (2000a)：培養細胞を用いる簡便・迅速なバイオアッセイに関する研究の現状と課題. 生産研究, 52, 89-95.
- 庄司 良・迫田章義・酒井康行・内海英雄・鈴木基之 (2000b)：バイオアッセイで評価した化学物質および環境水の複合的な毒性の定量評価. 水環境学会誌, 23, 487-494.
- 庄司 良・酒井康行・迫田章義・山田正人・毛利紫乃・安原昭夫・井上雄三 (2003)：バイオアッセイを活用

- する廃棄物最終処分浸出水の毒性原因物質の推定. 水環境学会誌, 6, 643-648.
- 杉田 創・駒井 武・西脇淳子・川辺能成 (2010): 石油系炭化水素を対象とした発光バクテリアを用いた簡易土壌汚染評価手法の開発－抽出溶媒の選定および石油系炭化水素の毒性評価－. *Journal of MMIJ*, 126 (12), 684-690.
- 杉田 創・駒井 武・井本由香利・原 淳子・今泉博之 (2013): 発光バクテリアを用いた重金属等の土壌汚染簡易評価手法の開発－急性毒性評価による土壌汚染濃度のスクリーニング－. 地下水学会誌, 55 (4), 329-347.
- 杉田 創・駒井 武・井本由香利・原 淳子 (2016): 発光バクテリアを用いた土壌汚染簡易評価手法の開発2－メッキ金属に関する急性毒性評価－. 地下水学会誌, 58 (4), 417-430.
- 杉田 創・駒井 武 (2018): 発光バクテリアに及ぼす液中ナノ粒子の急性毒性影響について－ナノ粒子分散液を用いた急性毒性評価試験による検討－. 地下水学会誌, 60 (4), 435-459.
- 杉田 創・駒井 武 (2020): 石油系炭化水素を対象とした発光バクテリアを用いた簡易土壌汚染評価手法の開発2－メタン系炭化水素（アルカン類）に関する急性毒性評価－. 地下水学会誌, 62 (1), 59-73.
- 鈴木基之・金 範洙・孫 晋彦・酒井康行・迫田章義 (1998): バイオアッセイによる水処理の評価. 生産研究, 50, 131-134.
- 田中渥夫・福井三郎 (1980): 微生物による n- アルカンおよびメタノールの変換. 有機合成化学, 38 (1), 33-46.
- 豊本 豊・出口 修・平野千里・楠井隆史・橋本隆司・荒井章寛 (2006): 産業廃棄物最終処分場浸出水のバイオアッセイに関する研究 (第2報). 平成18年度富山県環境科学センター年報, 34, 114-119.
- 長島 寛・藤原朋広・国本 学 (2001): バイオアッセイによる排水試料の有害性評価に伴う問題. 水環境学会誌, 24, 110-114.
- 三木康朗・杉本義一・小野重好・町田 基 (1997): 石炭液化ナフサと直留系ガソリンの組成の比較. 日本化学会誌, 2, 570-574.
- 村上昭彦・松田時雄・渡辺展宏・長沢伸一 (1976): 海洋微生物による n-paraffin の分解について. *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, 32, 242-248.
- 村上昭彦・長沢伸一 (1978): 海洋石油分解細菌による Alkylbenzene, A 重油, および Iranian heavy 原油の消失速度について. 水質汚濁研究, 1 (2), 107-113.
- 村上昭彦・鈴木一信・長沢伸一 (1985): 海洋微生物による原油の分解について. 水質汚濁研究, 8 (6), 373-379.
- 山川雅弘・水谷博和・前田雅也・早川修二・伊藤友夫・高桑三明・中谷純夫 (1998): バイオアッセイを用いた毒性評価について (第3報)－工場排水の評価について－. 三重県環境科学センター研究報告, 18, 9-16.
- Codina, J. C., A. P-Garcia and A. de Vicente (1994): Detection of heavy metal toxicity and genotoxicity in wastewaters by microbial assay. *Water Science Technology*, 30, 145-151.
- Claxton, L. D. (2014a): The history, genotoxicity, and carcinogenicity of carbon-based fuels and their emissions: 1. Principles and background. *Mutation Research*, 762, 76-107.
- Claxton, L. D. (2014b): The history, genotoxicity, and carcinogenicity of carbon-based fuels and their emissions. Part 2: Solid fuels. *Mutation Research*, 762, 108-122.
- Claxton, L. D. (2015a): The history, genotoxicity, and carcinogenicity of carbon-based fuels and their emissions. Part 3: Diesel and gasoline. *Mutation Research* 763, 30-85.
- Claxton, L. D. (2015b): The history, genotoxicity, and carcinogenicity of carbon-based fuels and their emissions. Part 4: Alternative fuels. *Mutation Research* 763, 86-102.
- Claxton, L. D. (2015c): The history, genotoxicity, and carcinogenicity of carbon-based fuels and their emissions. Part 5: Alternative fuels. *Mutation Research* 763, 103-147.
- Fulladosa, E., J.C. Murat, M. Martinez, I. Villaescusa (2005): Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri* bacteria. *Chemosphere*, 60, 43-48.
- Gellert, G. (2000): Sensitivity and significance of luminescent bacteria in chronic toxicity testing based on growth and bioluminescence. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45, 87-91.
- Grund, A., J. Shapiro, M. Fennewald, P. Bacha, J.

- Leahy, K. Markbreiter, M. Nieder and M. Toepfer (1975): Regulation of Alkane Oxidation in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 546-556.
- Hsieh, C.-Y., M.-H. Tsai, D. K. Ryan and O. C. Pancorbo (2004): Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fischeri* in the Microtox® chronic toxicity test. *The Science of the Total Environment*, 320, 37-50.
- International Labour Organization: International Chemical Safety Cards (ICSCs). <https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.home>. (2020.2.13閲覧)
- ISO 11348-1 (2007): Water quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)-Part 1: Method using freshly prepared bacteria.
- ISO 11348-2 (2007): Water quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)-Part 2: Method using liquid-dried bacteria.
- ISO 11348-3 (2007): Water quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)-Part 3: Method using freeze-dried bacteria.
- ISO 21338 (2010): Water quality-Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other soils and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test).
- McKee, R. H. and R. T. Plutnick (1989): Carcinogenic Potential of Gasoline and Diesel Engine Oils, *Fundamental and Applied Toxicology* 13, 545-553.
- McCloskey, J. T., M. C. Newman and S. B. Clark (1996): Predicting the relative toxicity of metal ions using ion characteristics: Microtox® bioluminescence assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 1730-1737.
- McFeters, G. A., P. J. Bond, S. B. Olson and Y. T. Tchan (1983): A comparison of microbial bioassays for the detection of aquatic toxicants. *Water Research*, 17, 1757-1762.
- Mowat, F.S. and K.J. Bundy (2002): Experimental and mathematical computational assessment of the acute toxicity of chemical mixtures from the Microtox® assay. *Advances in Environmental Research*, 6, 547-558.
- National Library of Medicine: ChemIDplus. <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>. (2020.2.13閲覧)
- Swick, D., A. Jaques, J.C. Walker and H. Estreicher (2014): Gasoline toxicology: Overview of regulatory and product stewardship programs. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 70, S3-S12.
- Turner, N. R., D. A. Renegar (2017): Petroleum hydrocarbon toxicity to corals: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 119, 1-16.

(受付：2020年3月16日，受理：2020年9月2日)