〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
27 (4) 187-203 (1981)

環境汚染物質の分解性試験に関する研究の動向

藤 木 素 士

筑波大学・社会医学系・環境衛生学

Degradability-Test of Environmental Pollutant

MOTOO FUJIKI

Institute of Community Medicine・The University of Tsukuba,

1-1-1 Tennodai, Sakura-mura, Niihari-gun, Ibaraki-ken

With the progress in culture and technology, the production of a large amount of various chemicals contributed to the improvement of human life markedly.

On the other hand, it is growing to be a new problem that these chemicals threatened our health.

By coping with this new problem, making the parameters as the degradability, the accumulation potential and the toxicity of the chemicals, a clue to the decision of the standard, it is required to assess the risk of these chemicals, and the regulation came to be needed by all means.

The degradation and bioaccumulation tests for the assessment of the risk of the chemicals are required for the simulation of the degradation and the accumulation originated in the natural environment.

In this article, some recent studies will be introduced on the photodegradation and biodegradation tests for the assessment of the risk of chemicals.

Keywords—— chemicals ; photodegradation ; biodegradation ; bioaccumulation ; ecotoxicity ; environmental metabolism ; ecosystem ; ultra violet rays ; inoculum activity ; chemical load ; chemical assessment

1. はじめに

文明、科学技術の進歩とともに、膨大な数の化学物質が大量に生産されるようになった。人類が創り出した化合物が、有機化合物だけでも1000万種¹⁾にも達するともいわれ、現在日本で実用に供されている製品および中間物についてみても、その数は化学物質の審査および製造等の規制に関する法律²⁾および労働安全衛生法³⁾によると3600種、米国においては44000種⁴⁾と多数におよんでいる。これら化学物質は人々の生活の向上に著しく貢献してきた。しかし、有益性の反面それらの一部には強い毒性をもつものもある。これら化学物質が、製造、使用あるいは使用後の廃棄を通じて環境を汚染し、人の健康に脅威を与えるという新しい問題をひきおこすようになった。

化学物質による環境汚染問題がクローズアップされるにいたった発端は、水俣病の発生であった。水俣病は

1956年頃、水俣市周辺に発生した。最初は原因不明の神経系疾患として報告され、その後、メチル水銀中毒であることが明らかにされた。⁵⁾ このメチル水銀は、当時同市にあったアセトアルデヒドを生産する工場で、触媒として用いた水銀の副反応により生じたもので、⁶⁾これが海域に流出して魚貝類に蓄積され、その魚貝類を多食した住民に発症した。⁷⁾ 当時は、海洋においては無限に希釈されるので、廃棄物を海洋投棄することは、処理の方法であるという考え方を多くの人々がもっていた。しかし、内海の内湾という地理的条件のせいもあって、水俣湾に流出したメチル水銀は、それほど希釈されなかった。海水中のメチル水銀の濃度は、当時の分析技術では検出できない濃度であったが、海産生物は、これを意外な高濃度にまでその体内に濃縮した。このように水俣病は、化学物質を海洋投棄した場合、無限に希釈されるものではないこと、環境を汚染した化学物質は環境中の生

Fig. 1. Sources and Distribution of Chemicals in the Environment
(by OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group on
Degradation/Accumulation, Final Report Volume 1, 1979.)

物に蓄積されること、さらに環境を汚染した化学物質は直接あるいは生物蓄積を経て人の健康に障害をもたらすことなどをわれわれに教えてくれた。

水俣病に次いで1963年頃、富山県にイタイイタイ病が発生し、カドミウムによる環境汚染との関係が指摘され、またカネミ油症事件を契機として、ポリ塩化ビフェニル (PCB) による環境汚染が、社会的問題となった。これら一連の環境汚染についての対策が、後手の対策であったことの反省もあって、昭和48年10月に化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律が制定され、化学物質環境安全性総点検体系が昭和54年度から実施されるようになった。

以下に化学物質を人と環境とのかかわりあいの観点から眺め、この分野における最近の研究と対策のうち、化学物質の分解性試験の概要およびその国際的な動向を紹介することにする。

2. 環境中での化学物質の挙動

化学物質の製造、使用あるいは廃棄の過程において、大気中に放出された化学物質は、揮発性が高いものは大気圏に分配されるが、水への溶解性が高いものは雨水に溶解して水圏に移る。水中に放出された化学物質については、揮発性が高いものは大気圏に分配され、水溶性が高いものは水圏にとどまり、吸着性が高いものは土壌圏に分配される。大気圏に移動したものは光分解や酸化などの非生物学的分解をうけ、水圏および土壌圏に移動したものは光分解、加水分解、酸化・還元などの非生物学的分解と微生物などによる生分解をうける。(Fig. 1)

水圏においては、化学物質が水生生物にとり込まれ、生体蓄積をおこし、食物連鎖を通して、より大型の生物あるいはより高等な生物へと移動する。この間の化学物質の挙動は、化学物質の分配係数、水への溶解性、生体膜透過性などにより支配される。また、化学物質には生

物に対して毒性を示すものがある。毒性の発現様式としては、急性毒性、慢性毒性、催奇形性、発癌性などがある。この毒性は、人類のみならず環境中の生物は少なからず影響を受ける。生態系に毒性がおよぶ場合が生態毒性である。

以上のことを考えると、化学物質の環境問題を論ずる場合、物理化学的性状、例えば揮発性、水への溶解度、吸脱着力、反応性および生物に対する性状、例えば生分解性、蓄積性、毒性などを調べておく必要があることが理解されよう。このように環境中での化学物質の挙動は、複雑に関係し合ったこれらの生態化学的な環境パラメーターによって決定される。⁸⁾

化学物質が、自然環境中に放出された場合、自然の浄化作用によりすみやかに分解して無毒な低分子化合物となり、とくに有機の化学物質の場合は、無機化して二酸化炭素、硝酸あるいは硫酸などとなって環境中を循環するならば、人類や他の生物に対して危害をおよぼすことはない。化学物質が水圏において分解され難いものであっても、水生生物に蓄積されないものであるならば、水生生物にとっても、さらにそれを捕食する生物にとってもその毒性はおよばない。また、化学物質が分解され難く、生物に蓄積されやすい場合であっても、その化学物質の毒性が認められないものであれば、人類や他の生物に危害はおよばない。

以上に述べた環境パラメーターは、いずれも化学物質の動態決定に重要な役割を果たしているが、これらのうち特に分解性、蓄積性および毒性は、化学物質が人類におよぼす健康障害の可能性を判断するのに重要なパラメーターである。これら分解性、蓄積性、毒性の3つの環境パラメーターは、人類に対するのみでなく、生態系における化学物質の環境代謝を論ずる場合にも重要なものである。これらのパラメーターについては、より環境に近い状態で、正確に、低経費で、しかも短時間に結果を得ることができるような試験方法によって種々の化学物質について試験を行う必要がある。

3. 光分解性

ある種の化学物質については、大気中で分解反応あるいは重合反応により変化を受けることが知られており、これらの反応に太陽光線、とくに紫外線が重要な役割を演じている。大気中の化学物質は光分解かあるいは酸化分解を受け、生分解を受けることはほとんど考えられない。したがって、大気中化学物質の分解性については光分解を主体として考えればよい。水中の化学物質は紫外線、可視光線が到達する表層部においては光分解を受けるであろう。しかし、大部分の化学物質は生分解を受ける

であろう。また、土壤に吸着された化学物質は、紫外線、可視光線が到達する表層部においては光分解を受けるであろう。しかし、大部分の化学物質は生分解を受けるであろう。

このように、大気圏、水圏、土壤圏のいずれにおいても光分解は進行する。しかし、大気圏における光分解、水圏における光分解、土壤圏における光分解とでは、それぞれに分配される化学物質やその性状が異なること、光分解反応の条件が異なることなどの差異がある。

3-1. 大気中化学物質の光分解 大気圏に分配する化学物質は揮発性が高いものが主体で、大気中での光分解の対象となる化学物質はそのほとんどが常温で気体か液体である。

大気中化学物質の光分解の機構に関する研究に必要な設備はスモッグチャンバーである。しかし、大型のスモッグチャンバーを保有する研究機関は少なく、運転経費は莫大なものであり、基礎的研究には有効であるが、化学物質の光分解性スクリーニングテストにこれを使用するのは不適当である。

最近開発された実験室内気相光分解試験法 (Fujiki法)⁹⁾ は直径10 cm、長さ40 cmの石英管 (Fig. 2) に、水を相対湿度60%相当加えた高純度合成空気で希釈して10 ppm程度の濃度に調製した化学物質を封じ込み、300 nm (Fig. 3) と360 nm (Fig. 4) の2種の紫外線ランプにより紫外線を照射する装置を用いて、地上に到達できる波長の紫外線での光分解が、どの程度進行するかを測定するものである。照射装置にとりつける4本の石英

Fig. 2. Quartz Reaction Tube

(by OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group on Degradation/Accumulation, C80/101, OECD Test Guideline, 1979.)

Fig. 3. Spectroenergy of FL-20S-E Lamp
(by OECD Chemicals Testing Programme, Expert
Group on Degradation/Accumulation, C80/101,
OECD Test Guideline, 1979.)

Fig. 4. Spectroenergy of FL-20S-BL Lamp
(by OECD Chemicals Testing Programme, Expert
Group on Degradation/Accumulation, C80/101,
OECD Test Guideline, 1979.)

反応管のうち2本は実験群、他の2本は対照群に使用する (Fig. 5)。対照群の石英管は黒い紙または布かあるいはアルミニウムホイルでおおい、光があたらないようにする。紫外線照射は24時間連続で照射し、実験開始時、2時間照射、4時間照射、6時間照射および24時間照射時に石英管内の被検化学物質を採取し (Fig. 6)、ガスクロマトグラフ法など適切な分析法で残存する化学物質を測定する。分解率は次式により求められる。

$$\text{分解率}(X\text{時間}) = \left(1 - \frac{X\text{時間後の実験反応管中濃度 (2本の平均)}}{X\text{時間後の対照反応管中濃度 (2本の平均)}} \right) \times 100$$

使用する器具などへの吸着には充分注意をしなければならぬ。石英反応管を太陽光線に照射させ、その測定

Fig. 5. Irradiator Apparatus
(by OECD Chemicals Testing Programme, Expert
Group on Degradation/Accumulation, C80/101,
OECD Test Guideline, 1979.)

- A : FL-20S-BL lamp.
- B : FL-20S-E lamp.
- C : Quartz reaction tube.
- D : Magnetic stirrer.
- E : Turn table.

Fig. 6. Sampling Tube
(by OECD Chemicals Testing Programme, Expert
Group on Degradation/Accumulation, C80/101,
OECD Test Guideline, 1979.)

結果を紫外線照射の場合の結果と比較することにより、環境中での光分解性との関係についても検討できる。

大気中での光分解反応は、直接光エネルギーにより分解する場合と、大気中の水に起因する OH ラジカルにもとづく酸化により分解する場合¹⁰⁾ 発生するオゾンにより酸化分解する場合^{11,12)}や、大気中に微量含まれる他の化合物との反応による分解などが考えられる。^{*} この試験法では、光源に使用するランプの波長範囲の選択により光分解を広くシミュレートできる。

石英管壁面での壁触媒効果、吸着などが起る可能性に

TABLE I.* Proposed Reactivity Classification of Organics (and Selected Inorganics)
based on Reaction with the Hydroxyl Radical^{a)}

(by J.N. Pitts, Jr., A.M. Winer, K.R. Darnall, A.C. Lloyd and G.J. Doyle,
Ecological Research Series, EPA-600/3-77-001b, January, 1977.)

Rate constant ^{a)} $K [\dot{\text{O}}\text{H}]^{1/2}$ (Days) Class				
I 4.8×10^7 10	II $4.8 \times 10^7 - 4.8 \times 10^8$ 1-10	III $4.8 \times 10^8 - 4.8 \times 10^9$ 0.1-1	IV $4.8 \times 10^9 - 4.8 \times 10^{10}$ 0.01-0.1	V 4.8×10^{10} 0.01
Trifluoromethane	Trichloromethane	Neopentane	Ethylbenzene	2-Methyl-2-butene
1, 1, 2-Trichloro-1, 2, 2-trifluoroethane	Dichloromethane	Methanol	<i>n</i> -Octane	3-Carene
Tetrafluoromethane	Carbon monoxide	Methylacetylene	Diethyl ether	1-Methylcyclohexene
1, 2-Dichloro-1, 1, 2, 2-tetrafluoroethane	Ammonia	2, 2, 3, 3-Tetramethylbutane	<i>p</i> -Xylene	β -Phellandrene
Chlorotrifluoromethane	Acetylene	Cyclobutane	<i>p</i> -Ethyltoluene	Carvomenthene
Dichlorodifluoromethane	1, 2-Dichloroethane	Benzene	<i>o</i> -Ethyltoluene	<i>d</i> -Limonene
Fluorotrichloromethane	1, 2-Dibromoethane	Isobutane	<i>o</i> -Xylene	2, 3-Dimethyl-2-butene
1-Chloro-1, 1-difluoroethane	Ethane	Propane	Tetrahydrofuran	Dihydromyrcene
Tetrachloromethane	1, 1-Dichloroethane	<i>n</i> -Butane	Methyl isobutyl ketone	Myrcene
Difluoromethane	Chloroethane	Ethanol	<i>p</i> -Cymene	<i>cis</i> -Ocimene
Methane		Methyl ethyl ketone	Di- <i>n</i> -propyl ether	
2-Chloro-1, 1, 1-trifluoroethane		Isopentane	<i>m</i> -Ethyltoluene	
2-Chloro-1, 1, 1, 2-tetrafluoroethane		1-Propanol	Methoxybenzene	
1, 1, 1-Trichloroethane		2, 2, 4-Trimethylpentane	Methylamine	
Fluoromethane		2, 2, 3-Trimethylbutane	<i>m</i> -Xylene	
Dichlorofluoromethane		<i>n</i> -Propyl acetate	1, 2, 3-Trimethylbenzene	
2, 2-Dichloro-1, 1, 1-trifluoroethane		Allene	Diisobutyl ketone	
1, 1-Difluoroethane		2, 3-Dimethylbutane	Propene	
Chlorofluoromethane		Hydrogen sulfide	3, 3-Dimethyl-1-butene	
Bromomethane		2-Methylpentane	tene	
Chloromethane		<i>sec</i> -Butyl acetate	1-Pentene	
Chlorodifluoromethane		Toluene	1-Hexene	
		Cyclopentane	1, 2, 4-Trimethylbenzene	
		<i>n</i> -Propylbenzene	Methyl mercaptan	
		Isopropylbenzene	<i>o</i> -Cresol	
		<i>n</i> -Hexane	1-Butene	
		<i>n</i> -Pentane	1-Heptene	
		<i>p</i> -Menthane	1, 3, 5-Trimethylbenzene	
		1-Butanol	Isobutene	
		Cyclohexane	<i>cis</i> -2-Butene	
		2-Propanol	2-Methyl-1-butene	
		4-Methyl-2-pentanol	α -Pinene	
		3-Methylpentane	<i>cis</i> -2-Pentene	
		Ethene	β -Pinene	
			<i>trans</i> -2-Butene	
			Cyclohexene	
			1, 3-Butadiene	
			Isoprene	

a) Range of values (in litre mol⁻¹ sec⁻¹) for the rate constant for reaction of the OH radical with the listed compounds.

$\tau_{1/1} = 0.693 / k_{\text{OH}} [\dot{\text{O}}\text{H}]$, $[\dot{\text{O}}\text{H}]$ is assumed to be 10^7 radicals cm⁻³

* Table I は OH ラジカルに基づく酸化反応により分解する有機化合物の分解の難易度を5階級に分けて示したものである。

対して十分な検討が必要である。壁触媒効果については、直径を大きくした反応管、すなわち、単位体積当り表面積を変えて同時に光分解実験を行い、結果を比較することにより検討がなされた。直径 10 cm, 12 cm, 15 cm の 3 種についての比較の結果分解率に差がなく、壁触媒効果はないことが確かめられている。

3-2. 水中化学物質の光分解 水中化学物質の光分解性試験法に近藤¹³⁾の方法がある。内径 1.3 cm, 長さ 10 cm の共栓石英管に試料水溶液又はけん濁液 5 ml を入れる。水に不溶性の化学物質はエタノールに、あらかじめ溶解させ、その 0.5 ml に水を加えて 5 ml としけん濁させる。石英管は栓をほどき、閉鎖系で試験を行う。石英管は 1/4 の角度に傾けて固定し、30 cm の距離から紫外線 (360 nm) ランプを照射しながら振とうする。分解の進行は、ガスクロマトグラフ法などの適切な分析手段によって測定する。結果は半減するに要する照射時間で表示する。この方法は、次に述べる EPA (Environmental Protection Agency U.S.A.) 法と類似のものであるが、紫外線を用いるために反応が早く、スクリーニングテストとしては有効である。また、光源ランプの選択によっては波長範囲が任意に拡大できるので自然環境中での水中光分解のシミュレーションが可能である。

アメリカの EPA による試験法¹⁴⁾は次のようなものである。あらかじめ滅菌した内径 11 mm のハウケイ酸ガラス製反応管に、試料溶液を一杯に満し栓をほどく。屋外の日陰にならない場所に黒い敷物を置き、その上に反応管を垂直線から 30° の角度に傾斜して設置し、太陽光を照射させる。屋外への反応管の設置は、日の出前から日没までとする。試験可能の期間は温暖な季節に限る。試薬の調製はすべて無菌的に行い、化学物質の濃度は、水に対する溶解度の 1/2 以下で、かつ 10^{-5} M 以下、さらに 290 nm より長波長側に吸収がある場合、吸光度が 0.02 以下になるようにする。水に溶解し難い化学物質の場合は、アセトニトリルを最終濃度として 1 容量パーセント以下になるように用いて溶解させ調製する。また、カルボン酸、フェノール、アニリン、無機酸、塩基などについては、緩衝液で pH を 5, 7 および 9 に調整して光分解試験を行う。分析は適切な方法で行い、もし化学物質が 28 日間で 60—80% 分解される場合は、実験開始時および定期的に正午に測定する。28 日間で 20—50% 分解される場合は 28 日後に測定する。28 日後に 20% 以下の分解しかみとめられないならば半減期は 3 カ月以上である。7 日以内に 60—80% 分解する場合は実験開始時と毎日正午に測定する。1—2 日以内に 60—80% 分解する

場合は、実験開始時と 1 日目の日没後および 2 日目の日没時に測定する。測定結果からは、次式により K_p を求める。

$$\log_{10} \frac{C_0}{C_t} = \frac{K_p \cdot t_1}{2.30}$$

ここで C_0 は実験開始時の化学物質のモル濃度、 C_t は実験終了日 (t_1 日目) における残存化学物質のモル濃度、 K_p は分解速度係数である。 K_p から、さらに次式によって半減期を求める。

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K_p}$$

この試験法は Smith ら^{15,16)}の報告による水中化学物質の光分解実験の測定値を用いて、化学物質の光分解性をコンピューターで処理して半減期を求めた Zepp^{17,18)}の報告をもとにつくられたものである。試験は太陽光線照射によるものであるもので、自然環境における水中化学物質の光分解性をみるには近い条件のものであるが、試験操作などわずらわしが多く、結果が求まるまでに日時を要すること。天候による影響をうけること、冬季には試験できないことなど欠点が多い。

3-3. 粒子に吸着した化学物質の光分解 土壌などに吸着した化学物質に対しての光分解試験法として西ドイツの GSF (Der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung) 法¹⁹⁾がある。この試験法では、冷却装置のついた小さな密閉ダブルフラスコの反応管 (Fig. 7) を用いる。この反応管中に吸着剤としてシリカゲル (粒径 0.063—0.2 mm, 比表面積 450 m²/g) を入れ、0.5 μ g 程度の化学物質を加え、酸素を充分に通気し、系中に二酸化炭素 (CO₂) が存在しないことを確認後、高圧水銀灯により紫外線を照射する。1 時間照射後中断し、酸素を通気して光分解にともなって発生する CO₂ を高感度赤外二酸化炭素計を用いて測定する。この操作をくりかえし、発生した CO₂ 量と理論値との比を算出する。レファランス物質としては、塩化フェノール (PCP)、ビフェニルを用いる。この試験法は、大気中に存在するエアロゾル (粒子) が化学物質に対して凝縮の核となったり、あるいは吸着等温線に依存して化学物質を吸着し得るという考えと、また、吸着された相が土壌表面をシミュレートしていることにもとづいてつくられた。この試験法では、エアロゾルあるいは土壌の代りにシリカゲルを用いている。感度は、吸着剤 1 g 当り 50 μ g の化学物質の濃度で実験することにより高めることができる。光源にパイレックスフィルターをつけることにより 290 nm よりも短波長の紫外線は除去する。

この試験法は、化学物質を CO₂ にまで分解する割合

Fig. 7. Apparatus of GSF-Test

(by OECD Chemicals Testing Programme, Expert
Group on Degradation/Accumulation, C80/107,
OECD Test Guideline, 1979.)

1. UV-source.
 2. cooling jacket.
 3. reaction chamber.
 4. gas (oxygen) inlets.
 5. gas (reaction products) outlets.
- h=80—90 mm.
b=45—50 mm.
c= 3— 4 mm.

を測定することに特徴がある。しかし、高感度赤外線二酸化炭素分析計を必要としたり、ラベルした化学物質を用いて低濃度での試験を行うなど特殊な研究機関以外において実施し難いという欠点がある。また、エアロゾルの代わりにシリカゲルを用いることには多少の無理があると思う。

3-4. OECD ケミカルグループにおける光分解性の検討
OECD は経済発展に伴う化学物質による環境汚

染に深い関心を示し、人類の健康はもとより環境における生態系に影響をおよぼすような化学物質の国際的規制を行うべくその作業を進めてきた。²⁰⁾ この構想は、化学物質をアセスメントし、化学物質が人類あるいは環境の生態系に影響をおよぼすものを予測し、危険性があると予測された化学物質を規制しようとするものである。アセスメントに際しては、分解性、蓄積性、毒性がパラメーターとして取りあげられた。化学物質についてこれら

Fig. 8. Distributions of Degradation Results

(by OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group on Degradation/Accumulation,
Ring-Test Programme, 1979/80 on Detecting Abiotic Degradation of Chemicals, 1980.)

を標準化された試験法で試験し、それらの結果から評価することになる。この際の試験法が各国間で異なり評価の基準も異なるならば、当然国際問題にまで発展することになるであろう。そこで、OECD ケミカルグループではエキスパートグループをつくり、それぞれについて統一試験法を定めるための検討を開始した。

光分解性については、OECD 加盟各国から提案された光分解性スクリーニング試験法について検討した結果、実験室内気相光分解試験法 (Fujiki 法)、実験室粒子表面光分解試験法 (GSF 法) および実験室水相光分解試験法 (EPA 法) の3試験法が選定された。これら3試験法について、1979年にOECD加盟国によるリングテストが実施された。²¹⁾ 被検化学物質としてはヘキサクロロベンゼン (HCB)、4-ニトロフェノール (4-NP)、ベンゼン (Bz)、メタノール (MeOH) および四塩化炭素 (CCl_4) の5物質が選ばれた。リングテストには加盟国の17研究機関が参加し、Fujiki 法について6機関、GSF 法について8機関、EPA 法について6機関がテストを行った。結果を Fig. 8 に示した。HCB、 CCl_4 についての分解性は3試験法とも一致していた (Fig. 8)。4NP については Fujiki 法、EPA 法で易分解性との結果が得られた。MeOH については3試験法間で異なった結果が得られた。それぞれの化学物質の分解性の傾向としては3試験法とも類似の結果が得られた。光分解小グループは3種の試験法についてのリングテストの結果、それぞれの試験法の特長、反応条件の差異などをも含めて検討した結果、3試験法ともにOECDの試験法として提案することを報告した。

以上に最近の光分解試験法の概要を紹介した。光分解試験法に関しては研究が比較的少なく、反応機構にも不明な点も多く、今後の研究の発展が望まれる。

4. 生分解性

4-1. 土壌分解法 水中あるいは土壌中での化学物質の分解はほとんどが生分解によると考えられる。最初に開発された生分解性試験法は、おそらく農薬の土壌中分解・残留のための土壌分解法²²⁻²⁵⁾ であろう。この試験法は土壌中に化学物質を加え、主として土壌微生物による分解性をみるものである。試験条件としては好気的に行う場合と湛水状態で行う場合とがある。手法として、ラベルした化合物を用い、環境中での化学物質の挙動の追跡を行うことができるので、OECD ケミカルグループで用いているテストレベル²⁶⁾ では、高次のシミュレーションテスト法として評価できる (Table II に示したように、OECD ケミカルグループは生分解テスト法を3階級に区分しており、レベル1はスクリーニング

のための簡便な生分解性テスト法、レベル2は本質的に生分解性の有無を問うテスト法、レベル3は本質的に生分解性がある化学物質について究極的な分解性を自然環境の生分解性にシミュレートできるようなテスト法である)。土壌分解法に基づく一般化学物質の生分解法に関する最近の研究としては Mikami ら²⁷⁾ の報告がある。

これらの土壌分解法の欠点は、土壌の種類、性質、採取条件などにより分解度に大きなばらつきを生ずることである。

4-2. 改良 OECD 法 1978年、OECD 分解性/蓄積性グループは、従来の OECD 法²³⁾ を溶存有機物 (DOC) を指標として分解性の追跡ができるようにした改良 OECD 法²⁹⁾ を提案した。この試験法では家庭廃水処理場の二次廃水または土壌抽出物のいずれかを微生物源として用いている。易分解性標準物質としては、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (Marlon A) を、難分解性標準物質としてテトラプロピレンベンゼンスルホン酸ナトリウム (TPBS) を微生物活性度のチェックに用いる。微生物は Marlon A を14日で92% (メチレンブルー除去率)³⁰⁾ 以上、TPBS を19日で35%以下に分解する能力のものでなければならない。化学物質の生分解性は DOC で経時的に測定する。この試験法は微生物の活性度および菌数を同時に規定して標準化した点に特徴がある。しかし、生分解性を DOC で測定するために、その適用範囲が限られるという欠点がある。

4-3. MITI (Ministry of International Trade and Industry) 法 1975年、わが国においては、化学物質の審査および製造等の規制に関する法律 (化審法) の成立とともに、通産省は MITI 法³¹⁾ を開発した。この試験法では、微生物として標準汚泥を用い、生分解の標準化ができるようにしている。汚泥は日本全国の10箇所から採取した活性汚泥や表層水などを混合培養して調製し、頒布している。汚泥の活性度は、アニリンについて試験し、1週間で40%を越える分解度をもつものでなければならない。³²⁾ 化学物質の分解性はクローメーターを用いて汚泥が消費する酸素量を2週間連続的に測定することにより追跡される (Fig. 9)。また、2週間後には化学物質の残存量の測定も行う。化学物質によっては、馴化に時間を要したり殺菌性または増殖阻害性をもつものがある。このような化学物質の場合に対応するために、化学物質負荷 (化学物質/汚泥量) を通常の100/30から30/100に下げ、分解期間を4週間に延長する逆転法が開発された。³³⁾ また、最近では、水に難溶性の化学物質についての標準汚泥による生分解性を、ラベルした化学物質を用いて実験し、分解機構を明らかにする

TABLE II. Levels of Biodegradation Testing
(by OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group on
Degradation/Accumulation, Final Report Volume 1, 1979.)

Level I. Screening tests for readily biodegradability			
	Maximum duration of test ^{a)} (days)	% degr. (provisional data)	Criterion
OECD-screening-test	28	60	DOC
MITI-test	28	50/70	BOD/LOPC ^{c)}
AFNOR-test	28	60	DOC
Sturm-test ^{b)}	28	50	CO ₂
Closed bottle-test ^{b)}	28	50	BOD

Level II. Tests for inherent biodegradability			
Significant biodegradability under favorable experimental conditions, guided by environmental conditions			
	Primary	Ultimate	Criterion
Zahn-Wellens-test	20 ^{d)}	70 ^{d)}	DOC
Test with "strongly" acclimatized inoculum and/or extended test duration	?	?	Residue analysis may be necessary in conjunction with eco-toxicity testing.
SCAS-test	20 ^{d)}	70 ^{d)}	
Soil tests	?	?	
and others	?	?	

Level III. Environmental simulation test for the ultimate degradability on compounds found to be inherent biodegradability	
OECD-confirmatory-test/porous pot coupled unit test	Residue analysis needed as well as kinetic data.
Soil tests	
and others	

a) The first contact between inoculum and test material defines "time zero" of the test.

b) Acclimatization period not exceeding 14 days may precede actual testing.

c) Loss of parent chemicals.

d) For details see test flow scheme "Biodegradation."

とともに、化学物質負荷、濃度などが生分解におよぼす影響について検討した報告がある。^{34,35)}

この試験法は、水溶性で揮発性がなく、易分解性の化学物質には比較的問題なく適用できるが、揮発性、難溶性、難分解性および微生物に対し毒性を発揮する化学物質に対しては問題があるようである。

4-4. Sturm 法 Sturm 法³⁶⁾ は、微生物源として馴化汚泥を用い、化学物質を分解する際に発生する CO₂ を空気 (CO₂ を除去したもの) でみちびき、水酸化バリウムを用いて定量するものである。汚泥は、通常家庭下水の汚泥を化学物質に試験前 2 週間接触させることによって馴化させる。この馴化により、微生物に対して毒性や増殖阻害性を示す化学物質にも適応できるようになることもある。また、通常の化学物質の場合は馴化処理のため試験期間中の生分解度がよくなり、大きな生分解性

を示す。²⁶⁾ 馴化した微生物は、グルコースを 2 週間で、80% 以上分解する活性をもっていなければならない。この試験法には空気導入のコントロールの困難さ、培養液の蒸発および化学物質の揮発の問題などの欠点がある。

4-5. Zahn-Wellens 法 この試験法³⁷⁾ には、微生物源として都市または工場廃水処理場の汚泥で、とくに生長がいちじるしい対数増殖期のものを使用する。活性はジエチレングリコールを 9—14 日で分解してしまうことによりチェックする。化学物質の生分解度は溶存有機物 (DOC) または化学的酸素要求量 (COD) の測定により行う。この試験法は最も強力な生分解試験法とされている²⁸⁾ が、その試験条件などから考えて、環境中での化学物質の生分解性、挙動を追跡するためのシミュレーション法としては適切ではないように思われる。

4-6. French-AFNOR (L'Association Francaise

Fig. 9. Coulometer

(by OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group on)
 Degradation/Accumulation, C80/113, OECD Test Guideline, 1979.)
 Principle of closed system oxygen consumption measuring apparatus

The coulometer is an instrument for measurement on the oxygen consumption of micro-organisms by employing an electro-chemical analysis process (coulometry).

The specimen contained in cultivating bottle ① is stirred by means of ② magnetic stirrer. When the reaction progresses, DO in liquid will be consumed. Oxygen (O_2) in the space in the cultivating bottle is dissolved in liquid, resulting in generation of CO_2 in place of it.

As this CO_2 is absorbed by ③ soda lime, the partial pressure of oxygen in the space and total pressure go down. The drop in pressure is detected and converted into electric signal by means of ④ electrode type manometer and is amplified by ⑤ amplifier for operating ⑥ relay circuit, resulting in operation of ⑧ synchronous motor. Simultaneously, by constant current, electrolytic oxygen is generated from sulphuric acid copper solution contained in ⑦ electrolytic bottle.

This oxygen is supplied to the cultivating bottle and recovery of pressure is detected by means of the manometer, resulting in turning off the relay circuit and stopping of the electrolytic and synchronous motor.

The upper space in the cultivating bottle is always kept in a constant pressure by supply and stopping of oxygen (O_2) and the oxygen quantity consumed in the cultivating bottle is in proportion to the electrolytic oxygen quantity. As this electrolytic oxygen quantity is in proportion of electrolytic time as it is of constant current electrolysis. Accordingly, the revolution angle of ⑨ synchronous motor is converted to mV signal by means of the interlocking potentiometer, resulting in indicating consumed oxygen quantity at ⑩ recorder.

de Normalisation) 法 この試験法³⁸⁾の特徴は、全試験を無菌操作で行うことである。微生物源は、3箇所の都市下水処理場の廃水混合物とし、菌数を $(5 \pm 3) \times 10^5$ 個/ml に調製する。活性度はグルコースを7日で80%以上分解する活性をもつものでなければならない。一般に生分解性試験では、微生物はその活性度のみチェックされるが、生菌数についての規定はなされてい

ない。このような場合、植種に際して、試験ごとに生菌数/死菌数のバランスが異なり、生分解度にばらつきを与えることになる。この試験法では生菌数をそろえるので安定した結果を与える。

4-7. Closed Bottle 法 Fisher ら³⁹⁾が1974年に開発した試験法である。この試験法は JIS 法⁴⁰⁾および EPA 法 (TSCA (Toxic Substances Control Act))⁴¹⁾と

同じ内容をもったもので、微生物源としては家庭廃水を用い、生分解性は溶存酸素 (DO) を測定して追跡する。化学物質は、汚泥および無機培地とともに孵卵瓶に封入され、一定時間後の DO の変化が測定される。長期にわたる試験や高濃度試料の試験では DO 測定に誤差を生ずることがある。EPA 法 (TSCA) ではこの欠点をおぎなうため馴化汚泥を用い、測定時間の短縮を行っている。生分解度の算出は次式によっている。

$$\text{生分解度}(\%) = \frac{(\text{BOD}_T - \text{BOD}_M)}{\text{BOD}_T} \times 100$$

BOD_T および BOD_M は生物学的酸素要求量の理論値および測定値である。

生分解性スクリーニング手法としてよく用いられる方法である。

4-8. OECD ケミカルグループにおける生分解性の検討 OECD 加盟国によるリングテストが 1978 年⁴²⁾と 1979 年⁴³⁾に実施された。1978 年のリングテストでは次の 6 試験法について 5 種の化学物質について検討された。

Methods

- (1) Modified OECD-Screening-Test (obligatory)
- (2) MITI-Test (optional, recommended)

TABLE III. The Contributions to the Six Test Methods are distributed as Follows (Number of Laboratories)

(by OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group on Degradation/Accumulation, Final Report) Volume I, 1979.

39	to Modified OECD-Screening-Test
11	to MITI-Test
16	to Closed-Bottle-Test
11	to Sturm-Test
24	to Zahn-Wellens-Test
7	to AFNOR-Test

- (3) Closed-bottle-Test (optional)
- (4) Sturm-CO₂-Test (optional)
- (5) Zahn-Wellens-Test (optional)
- (6) AFNOR-T90-302-Test (optional)

Test Materials

- (1) 4-Nitrophenol (4-NP)
- (2) Diethylene glycol (DEG)
- (3) Sodium tetrapropylene-benzenesulfonate (TPBS)
- (4) Aniline (A)

TABLE IV. Participation

(by OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group on Degradation/Accumulation, Ring Test) Programme 1979/80 on Detecting Biodegradability of Chemicals in Water (Ring-Test II), 1980.

Lab. Code No.	Number of runs with test materials								Date of 1st contri- bution
	Obligatory			Emphasized			Optional		
	MOECD	MITI 1	MITI 2	AFNOR	Sturm	ClobT	HybOA	ZaWeT	
23	6	1	1	-	-	-	-	-	6.3
26	8	-	-	-	-	4	-	4	10.3
37	4	-	-	4	-	-	4	-	7.2
41	6	5	5	-	-	-	-	-	27.1
43	4	10	10	4	10	5	-	4	1.2
51	12	10	12	-	-	-	-	-	5.2
55	4	6	5	4	-	3	-	4	12.2
60	6	6	6	-	-	-	-	-	6.3
70	2	-	-	-	-	-	2	-	18.1
74	5	-	-	2	-	5	-	-	6.3
79	4	6	6	-	12	10	-	4	24.1
81	4	-	-	-	-	-	-	-	13.2
92	4	4	4	-	-	-	-	4	4.2
96	4	4	4	4	10	4	-	4	1.2
Total :									
runs	73	52	53	18	32	31	6	24	
lab.	14	9	9	5	3	6	2	6

Fig. 10. Frequency of Ranking on Places from "HARD" to "SOFT"
 (by OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group on)
 (Degradation/Accumulation, Final Report Volume 1, 1979.)

(5) Sodium 4-acetyl-amino-benzenesulfonate
 (=N-acetyl-sulfanilate=SAS)

このリングテストには加盟各国の41研究機関が参加した (Table III). 集められた結果を Fig. 10 に示した. TPBS, DEG, A については各試験法の間に類似の生分解性の傾向がみられた. OECD ケミカルグループには, できるだけ少数の試験法に統一したいとする意図がある

ようであるが, これらの試験法のうち, いずれを選ぶかとなると, その判断は困難なものになる. また, それぞれの試験法には一長一短があり, 改善が望まれる点もリングテストの結果指摘された.

1979年のリングテストは次の8試験法について6種の化学物質について検討された.

Fig. 11. Flow Scheme of Biodegradation

(by OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group on)
 Degradation/Accumulation, Final Report Volume 1, 1979.

Outcome: Revised estimate of environmental concentration (s) of compound and/or biodegradation products.

* N.F.W.: No further work on biodegradation testing.

** W.P.C.: "Worst possible case."

Methods

(1) Modified OECD-Screening-Test (MOECD)	(5) Sturm-Test (Sturm) emphasized
obligatory	(6) Closed-Bottle-Test (ClobT) emphasized
(2) MITI-Test (MITI 1) obligatory	(7) Hybrid OECD/AFNOR-Test (HybOA)
(3) MITI-Test without preacclimation (MITI 2)	optional
obligatory	(8) Zahn-Wellens-Test (ZaWeT) optional
(4) AFNOR-Test (AFNOR) emphasized	試験方法(1)―(6)は、最初のリングテストからの経験に
	基づいて選定された試験法である。(7)、(8)の方法は、将

Fig. 12. 1978 Work Program for the Environmental Assessment of the Existing Chemicals in Japanese Government

(by Environment Agency, the Second Meeting of the Panel of Identification and Control of Toxic Substances under the Japan-US Environmental Cooperation Agreement.)

— : Planning and evaluating of *-marked action is advised by expert members of the Advisory Committee.

..... : Action enclosed with a solid line has been put into since 1976.

来さらに検討するための候補であり, (7)は(1)と(4)の代りに, (8)は本来化学物質の処理のための生分解性試験法である.

Test Materials

(1) Diethylene glycol (DEG)

(2) 4-Nitrophenol (4NP)

(3) Anthraquinone (Atq)

(4) Thioglycolic acid (TGA)

(5) 4-Methyl-2,4-pentane-diol (MPD)

(6) Di-stearyl-thiodipropionate (DST)

これらの試験法は、このリングテストにそなえて改訂されたものであった。リングテストには加盟国の14研究機関が参加した (Table IV)。テストの結果、すべての試験法は、おおむね可能なものであったが、いくつかの試験法には実施の段階で若干の違いが指摘された。このリングテストでは、生分解性試験にとって重要な微生物源、濃度、生菌数などの問題が重点的に検討された。標準化とその実施については適切な活性チェックがなされなければならない。このリングテストによって、有効な試験法が種々の角度から検討され化学物質生分解試験法の結論を出すためのチェックがなされた。

なお、Fig. 11 に化学物質の生分解性に対するアセスメントの進め方についての OECD ケミカルグループの構想を示した。

おわりに

以上に化学物質の分解性試験法に関する最近の研究を紹介した。この分野の研究にたずさわり、試験法の開発研究が以前思っていたよりも重要なことであり、かつ、その標準化はむずかしいものであることを痛感した次第である。

昭和40年代の高度成長期は、また、いちじるしい環境汚染の時期でもあった。増産は産業廃棄物や副産物を増大させ、無制限に環境に放出させた。この結果、公害問

題をひきおこし、有害物質の排出規制や廃棄物の処理などに関する多くの法律が生まれた。この時代の環境汚染のルートは工場排水、排煙および産業廃棄物による経路が主体で、この流れにより化学物質は環境中に放出されていた。しかし、種々の法律による規制でこのルートは次第に減少し、新たに製品の使用、消費および廃棄を通じて環境中に放出されるルートがあらわれてきた。この新しい問題に対して、化審法や有害物質規制法が生まれ、諸外国においても類似の法律が公布されるようになった。

このような経過をへて化学物質総点検が環境庁により実施されるようになり、後手の環境行政から次第に未然防止の方向に進みはじめた。水俣病の教訓が先手の環境行政を生み出したといえるが、まだ重要な問題が残されているように思う。筆者は水俣病原因究明当時、メチル水銀化合物が水俣病の原因物質であること、また、それが工場の製造工程中に触媒と製品から副生したものであることを証明した一人であるが、化審法によってもこのような副生物によるケースをチェックすることはできないのが気にかかる。人類をはじめ、地球上の生態系の安全性を保つための人類による努力が今後も必要とされるであろう。そして豊かな生態系が保たれることを願うものである。

引用文献および注

- 1) 万有百科大事典(15)化学, 小学館, 東京, 1977, p. 136.
- 2) 通産省, 既存化学物質名簿, 大蔵省印刷局, 1974.
- 3) 労働省, 昭和54年2月5日官報(号外).
- 4) EPA, TSCA Chemical Substance Inventory (Initial Inventory), May 1979.
- 5) 熊本大学医学部編, 水俣病, 秀版印刷, 熊本, 1966.
- 6) K. Irukayama, F. Kai, M. Fujiki, T. Kondo, *Kumamoto Med. J.*, **15** (2), 57 (1962).
- 7) 藤木素士, 熊本医学会雑誌, **37**, 494 (1963).
- 8) OECD Chemicals Testing Programme, 1st Meeting, 1978.
- 9) OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group on Degradation, C8/101, OECD Test Guideline, 1979.
- 10) H. Niki, P.D. Maker, C.M. Savage, L.P. Breitenbach, *J. Phys. Chem.*, **82**, 132 (1978).
- 11) S.M. Japer, C.H. Wu, H. Niki, *J. Phys. Chem.*, **78**, 2318 (1974).
- 12) T.A. Walter, J.J. Bufalini, B.W. Gay Jr., *Env. Sci. Tech.*, **11**, 382 (1977).
- 13) 近藤雅臣, 化学物質判定基準設定調査研究報告書, 日本公衆衛生協会, 1979.
- 14) OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group on Degradation/Accumulation, C80/114, OECD Test Guideline, 1979.
- 15) J.H. Smith, W.R. Mabey, N. Bohonos, B.R. Holt, S.S. Lee, T.W. Chou, D.C. Bomber, T. Mill, EPA-600/7-77-113 (1977).
- 16) J.H. Smith, W.R. Mabey, N. Bohonos, B.R. Holt, S.S. Lee, T.W. Chou, D.C. Bomber, T. Mill, EPA-600/7-78-074 (1978).
- 17) R.G. Zepp, D.M. Cline, *Environ. Sci. Tech.*, **1**, 359 (1977).
- 18) R.G. Zepp, *Environ. Sci. Tech.*, **12**, 327 (1978).
- 19) OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group on Degradation/Accumulation, C80/107, OECD Test Guideline, 1979.

- 20) OECD Chemicals Testing Programme, Env./Chem./79, 22, Paris, 1979.
- 21) OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group on Degradation/Accumulation, Ring-Test Programme 1979/80 on Detecting Abiotic Degradation of Chemicals, 1980.
- 22) R.J. Barker, *J. Wildlife Manag.*, **22**, 269 (1958).
- 23) B.N.K. Davis, *Ann. Applied Biol.*, **91**, 29 (1968).
- 24) C.D. Gish, *Pesti. Monit. J.*, **3**, 241 (1970).
- 25) C.A. Edwards, E.B. Dennis, D.W. Empson, *Ann. Applied Biol.*, **60**, 11 (1967).
- 26) OECD Chemicals Testing Programme, Tokyo Meeting, 1979.
- 27) N. Mikami, H. Gomi, J. Miyamoto, *Chemosphere*, **8**, 305 (1979).
- 28) OECD Environ. Directorate, Proposed Method for the Determination of the Biodegradability of Surfactants used in Synthetic Detergents, Paris, 1976.
- 29) Umweltbundesamt, OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group C Draft Working Papers, March 1978.
- 30) JIS K 3363-1968.
- 31) 通産省, 通産省公報, 特集号, **9** (昭和49年7月19日).
- 32) 通産省, 通産省公報, 特集号, **35** (昭和49年7月19日).
- 33) 北野 大, 高木 博, 阿南忠明, *ぶんせき*, **1977**, p. 420.
- 34) T. Yoshida, H. Kojima, *Chemosphere*, **7**, 497 (1978).
- 35) H. Inui, K. Itoh, M. Matsuo, J. Miyamoto, *ibid.*, **8**, 383 (1979).
- 36) R.N. Sturm, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 159 (1973).
- 37) R. Zahn, H. Wellens, *Chemiker-Zeitung*, **98**, 228 (1974).
- 38) AFNOR T90 302, L'Association Francaise de Normalisation, Paris.
- 39) W.K. Fischer, P. Gerike, R. Schmid, *Wasser-und Abwasserforschung*, **7**, 99 (1974).
- 40) JIS K 0102-1971, 33.
- 41) EPA, "Federal Register," March 16, **1979**, 16279.
- 42) OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group on Degradation/Accumulation, Final Report Volume 1, 1979.
- 43) OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group on Degradation/Accumulation, Ring-Test Programme 1979/80 on Detecting Biodegradability of Chemicals in Water (Ring-Test II), 1980.