蓄積性試験の手法と問題点

久留宮 弘 幸*

The Method of Bioaccumulation Test and the Point at Issue

Hiroyuki KURUMIYA*

I. 試験法とその実際

もし化学物質が難分解性のものとなれば、環境下に流出した時、各種の生物体内に蓄積される可能性は多分に生じてこよう。まず河川への流下は確実でありその結果として水中に棲息する生物の体内に入る。小さなものでは、微生物、原生動物、あるいは植物に、大きなものは当然魚介類であり、その吸収のメカニズムは不明ながらも、食物連鎖、皮膚呼吸、代謝、など、種々の経路をとり生体内に蓄積・濃縮される。

魚介類は当然人間生活に食物連鎖の過程としてめぐりめぐってくるわけである。PCB や有機水銀などはその典型的な例であり、食用とされる魚に相当量の蓄積が見られるため、大きな社会問題が提起された。

水中に棲息する生物においては、生体内への蓄積の機構は、食物連鎖系として経口による体内への吸収、すなわち、消化器系統と、エラなどの呼吸器系、あるいは、皮膚呼吸などによる体表面細胞膜を通しての吸収とがある。専門家によれば経口よりは、はるかに呼吸器系を経る吸収、蓄積の方が圧倒的であるとされている。したがって本法律でのチェックシステムはエラから、あるいは体表面から吸収蓄積されるパターンを調べる方法として試験法が規定された。

水中生物に化学物質の蓄積がみられる場合はその化学物質が、環境下でもしも安定であり、分解消滅もせずに地球の系内にひそやかに推積していくことは、人類にとって大きな禍根となる可能性を秘めるものである。このチェックシステムが、水中生物の蓄積にポイントを絞った理由はこのことであり、また、水中生物のこの種の蓄積

が広域に見られれば、環境の汚染の目安となりうる。

蓄積性の試験は、魚に限らず、イトミミズなどの生物についても試みられているが生物のコントロール（実験上での）は矢張り魚の方が確実であるとともに、広い意味でのコンセンサスを得ることができる。

なお、大事なことは、この蓄積性試験は化学物質の魚への毒性をうんぬんする問題ではなく、魚体にそのものが蓄積するかどうかのみを追究するものであることをあらかじめおことわりしておきたい。TLm 試験、これは魚の急性毒性試験であるが、ちょうど、ラットやマウスなどの LD₅₀ の試験と類似するが、全く補助的に用いられることであって、この試験法の主体ではない。

II. 試験の構成

＜対象とされる生物＞ 試験に用いられる水中生物はコイである。また補助的要素を受けもつものとしヒメダカが用いられる。ただし、ヒメダカは試験条件設定のための予備試験として行なう TLm (median Tolerance Limit) 試験に使用するのである。TLm 試験^{1,4)} というのは、一種の急性毒性試験で、化学物質が溶解された水中に飼育されるメダカの 50% が、ある定められた時間、生存している場合の化学物質の濃度を調べるものである。

さて、諸外国の蓄積性試験の報告にはニジマス^{2,3)} を使って行なわれたものが多い。一方、日本人の食生活では海産物がかなりの比重を占めている点など考慮すると問題もないでもないが、次のような理由でコイが選ばれた。

(イ) 蓄積性試験を大規模に行なう試みは、本邦はもとより、世界でも始めてのことであるため、飼育技術、設備上問題の少ない淡水魚を考慮した。海水魚では、まず問題が多く、設備上からも難い点が多いからである。

(ロ) 本邦ではコイが淡水魚として比較的ポピュラー

* (財) 化学品検査協会化学品安全センター東京試験所 ()

* Chemical Inspection & Testing Institute, Chemical Biotesting Center ()

に分布し、また、各地で養殖されている。その他淡水魚としては金魚、フナなども考えられたが、データのバラッキがコイは比較的少ない。

(ハ) ニジマスは水、水温にかなり限定された要素を持っている。それに比べ、コイは比較的広い水温の範囲で飼育しうるし、また水質にそれ程大きく影響されない。

(ニ) 入手が容易であり、病気にかかりにくい、また、群としても、個としても生活しうる。

などの点があげられる。

ヒメダカは繁殖力があり、TLm 試験としてはかなりの数が必要で、年間通しで行なうにはコイの稚魚が供給の点でむづかしいので、ヒメダカに代えて行なうことになったためである。

＜構成上のポイント＞ この試験のユニークな点は「コイが化学物質によって、犯されることなく、健康な状態で、その代謝状況が通常と変りないように留意し、流水下で飼育する」ということである。この条件を満足させるためには下記に示す5つのポイントが、この蓄積性試験を構成するための主要点になる。

(1) コイの健康状態を保持するためには出来る限り、水中の化学物質の濃度を下げねばならない。

(2) 流水下であるために化学物質の濃度を絶えず調整しなくてはならない。

(3) 魚体中の化学物質の分析限界と水中濃度との関係を正確に捉える。

(4) コイの長期間にわたる試験飼育途中で病気にからせたり、死亡させたりしてはならない。

(5) 健康な、平均 10 cm 体長のコイを年間を通して供給する。

試験魚のコイは体長約 10 cm (吻端より尾びれの付根までの長さ) のものは体重が約 30 g 弱である。一般に春に産卵すると、次の年までは産卵しない。したがって、当才魚を用いなければならない。しかしながら、コイは1年間て条件がよければ 20~30 cm, 1 kg 以上のものにまで成長する。したがって10月~4月位までの試験魚の供給がきわめてむづかしい。また寄生虫の駆除、皮膚病の治療体内消毒など、大変気骨の折れる作業が要る。

この作業は徹底して行なわないと、もしも、試験実施中にコイに異常を生じた場合、供試している化学物質によるものか、それとも病気によるものかの判断がつきにくく、重大な問題になる。

飼育する試験水槽中の化学物質濃度を選定する場合、まず TLm 試験をヒメダカによって行なう、試験法は

JIS K 0102-72 55 項に示される方法によるか、時間は48時間である。48時間 TLm 値を決定したあとは、その値の 1/10,000 を最低の限界濃度とし、高い方で 1/100 までは許容する。

これの中間に 1/1,000 の濃度区を設定し蓄積性試験は上記濃度区のいずれかのつの濃度区を選ぶ、すなわち 1/100 と 1/1,000、あるいは 1/1,000 と 1/10,000 である。

もちろん、化学分析の技術の限界をここで考慮しなければならない。化学分析は、魚体中より化学物質を分離抽出する技術上の大変むづかしい問題をかかえている。設定濃度が薄く、低いものであればあるほど困難が増大し、一方、魚の方は生理的には濃度が低い方が代謝ならびに健康上は望ましいことになり、ここに一つの大きな矛盾を持つことになる。

さらに、流水下で試験水槽の設定濃度を維持することも至難である。後で述べることになるが、一定の割合で供試化学物質を希釈し供給することも実際には大変むづかしい。

具体例を述べれば、化学品安全センターでは年初(昭和49年)に PCB を第一番目の検討化学物質として試験を実施した。PCB はヒメダカによる TLm 値は 2 ppm したがって 1/10,000 濃度区では 0.2 ppb という設定をしなくてはならない。一方、化学分析上の Limit は、ECD 検出器(電子捕獲型)のガスクロマトグラフで、1 ppm がよいところであるが、さらに熟練すれば 0.5~0.3 ppm のオーダーは何とかということになる。しかし、これにもってくるには 300~1,000 倍濃縮ということになり、種々の汚染の可能性を考慮すると実際上はナンセンスな操作にならねないため、1/1,000 までに限界を設定した。ほぼ 2 ppb である。これで試験を開始したが、水槽中の PCB 濃度を実測してみると、設定値の約 6 割の値が得られおそらく、水槽壁面に吸着されて Loss となってしまったのであろう。

＜試験法＞ 試験の全般の流れをまず 図 1 に示す。コイは蓄養池から、いきなり 25°C の試験水槽に入れることはできない。たまたし、ある時期は可能なこともある。すなわち春秋の蓄養池の水温と試験水槽温度が近似する時期である。冬期の場合、蓄養池の水温が低いので、順化槽中に魚をうつし、1日~2日で 1~2°C 位ずつ上げて、順化してやる。

夏期の場合は逆に水温が高いので下げる方向に順化する。試験水槽中での試験飼育は8週間行ない、2週間毎に魚を取り上げて分析を行なう。

試験水槽の温度は 25°C ± 2°C とする。

図1 蓄積性試験のプロシード

化学物質の濃度は先に述べたようにヒメダカの TLM 試験の結果により決定され、少なくとも2濃度の条件で実施し、水中の化学物質濃度は1週間に1回以上実測をする。TLM 48 時間値の 1/10,000, 1/1,000, 1/100 の3濃度条件のうち分析しうる範囲でより低い濃度での2つの濃度区を設定し実施する。

たとえば TLM 値が 10 ppm であれば 1/10,000 は 1 ppb, 1/1,000 で 10 ppb, さらに 1/100 で 100 ppb となり、もし、1 ppb の分析値が確実に得られれば 1/10,000, 1/1,000 を実験する濃度とする。

蓄積性試験を行なう設備は、化学品安全センターとしては年間 140 件の化学物質をテストするに十分な“水系環境装置”（アクアトロン）を設計し、現在、稼動中である。そのフロシードを 図 2 に示す。

図2 水系環境調節装置

基本的には、井戸よりポンプアップした地下水を、化学物質を適当に溶かした原液と混合希釈して試験水槽に流すということである。

地下水には通常 N_2 が含まれているため十分バク質して DO (溶存酸素) を高めて試験に供する。

第一次希釈水タンクに入った水は原液タンクからの化学物質をやや高濃度に溶解した原液と混合槽で混ぜあわされて試験水槽に流下してくる。試験水槽にはコイが飼育されており、これを通った水はオーバーフローして排出される。

化学物質は外部に逃さぬように污水处理設備を通して排水する。破線で囲ってある系内には空調設備が必要である。

＜濃縮倍率と濃縮係数＞ 化学物質の蓄積の度合を結果として表示する場合、濃縮倍率と濃縮係数であらわす。

前者は2週間、4週間、6週間、8週間と、それぞれ各2週間毎に魚を取り出して分析した時点での濃縮倍率で

$$\text{濃縮倍率} = \frac{\text{魚体中の化学物質の濃度}}{\text{試験水中の化学物質濃度}}$$

である。

一方濃縮係数は 2, 4, 6, 8 と各2週間毎の分析によって得られた濃縮倍率を半対数グラフ上で縦軸にとり横軸に日数をとってプロットし、ほぼ平衡した近辺で接線を引いて原点での交絡した濃縮倍率を濃縮係数としてあらわす。

II. 問題点

＜溶解＞ 試験実施上、1つの困難な問題は水に不溶または難溶な化学物質の可溶化である。もちろん不溶とはいってもいくばくかは溶解するのである。その程度を知るのはなかなかむづかしい。そこで種々の助剤を用いて溶解させるわけであるが、厳密な意味では分散させるものもあろう。助剤の種類によっては TLM 値が低く毒性の強いものは用いられない。少なくとも 10,000 ppm 以上の低毒性のものが望ましい。

普通、アセトン、エチルアルコールなどの低分子の水溶性の溶剤、また Tween 系統の非イオン界面活性剤などの毒性の低いもの

を用いる。特に難燃剤、顔料、などのレジン状化学物質、高級な炭化水素、ポリマーなどがこの点非常にむづかしい問題となる。いずれにせよ。供試化学物質は可溶

化、溶解または分散させてやらなくては試験法の主旨と合わないわけである。

しかしながら、必要以上に助剤を使用することは考えものである。実際には環境下においてその排出された化学物質の周辺にそれほど多くの助剤が絶えず存在することもないであろう。さらに界面活性剤は臨界ミセルを形成するが、そのミセルの大きさにより魚のエラを通過しうかどうかの問題がある。細胞の構造に関連した、立体構造の要因についても今後、基礎的に検討する必要がある。

〈分析〉 魚体は水槽より取上げて後頭部を強打静止させ、布で表面を軽く拭いて水気を取り、秤量する。これを種々の手法で全体を一かつして処理し、分析に供する。

分析法はそれぞれの化学物質の性質に応じて、手法が異なるが、機器分析上からは感度的にガスクロマトグラフが最も多く適用される。高速液体クロマトグラフも応用が広く、クロマト分析が主体である。

分光分析も補助的に用いられ、さらに GC-Mass による質量分析も併用し、1つないし2つの以上の分析法を併用し確実性を期さねばならない。それは魚体中に含まれる脂質、タンパク質、アミノ酸、その他の種々の成分の妨害が避けられないからである。

もちろん、最後の機器分析にかかる前の前処理が大事で、これが確実か否かでデータの信頼性は全く異なってくる。生体組織の破かいはまず徹底して行なうこと、そしてカラムクロマトによるクリーンアップはどうしても必要であり、分析のプロセスは非常に複雑である。1つの物質の分析法の確立は通常では1年がそれ以上かかることも稀ではない。しかし本試験法では遅くとも8週間の魚の試験飼育の間に手法を開発すると同時にそれが確

実なものかを決めておかねばならない。

分析手法の確立から、この試験の律速段階となるのである。

おわりに

以上のように蓄積性試験の実施においては、非常に多くのややこしい技術上の問題点を内包しており、右から左へと試験を流すのは容易ではない。

当安全センターとしては、昭和48年度を含め、5年で500件の化学物質（既存）の検討を行なう、計画にはなっているが、達成にはなかなかの努力が必要であろう。

すでに約30件余の化学物質の検討をすませて来つつあるが、いずれもそれぞれにむつかしい問題を含んでいるものであった。

現在、確信している最善の手法を用いている積りではあるが、さらにより良い、確実な方法が、ありはしないか、一つの物質の検討の済むごとに絶えず自問し、模索しているのが、現状である。

そのために、最新の分析機器および、技術の導入をはかり、頭脳を駆使して日夜努力をつづけている。

おそらく一検体毎に得られる新しい経験と技術の蓄積は、やがて、新しい技術体系を生みだし、さらには人類の安全と繁栄をみちびくものであると信じる。

(昭和49年12月25日受理)

文 献

- 1) JIS K 0102-1971 解説 p. 216 日本規格協会
- 2) Kenneth R. Olson et al., *Journal of Fisheries Research Board of Canada* **30** 1575 (1973)
- 3) Kenneth, J. Macek et al., *Trans. Amer. Fish. Soc.* **99** 689 (1970)
- 4) 田端健二, 用水と廃水 **14** 51 (1972)