

水生生物に蓄積している未規制化学物質の実態の解明に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 25

担当チーム：水質チーム

研究担当者：岡本誠一郎、小森行也、北村友一

【要旨】

河川・湖沼等の水環境においてその存在が明らかになり水生生物への影響が懸念されている未規制化学物質の医薬品類については生物濃縮に関する知見は少ないことから、本研究ではその実態を明らかにするため、広く一般細菌に対する殺菌剤として石鹼、シャンプー等に含有されているトリクロサンをモデル物質として、魚類（メダカ、ゼブラフィッシュ等）への濃縮実態について調査した。

その結果、下水処理水を用いた調査によりトリクロサンの生物濃縮係数（BCF）は、メダカで 100～1,380、ゼブラフィッシュで 600～1,590 であり、また、実河川での調査によりヤマメが 360～700、モロコが 650 であった。

キーワード：生物濃縮、魚類、医薬品、トリクロサン

1. はじめに

現在、河川・湖沼においては環境基準が設定され、BOD、COD、重金属、有機塩素化合物、農薬等を指標とした水質管理が行われているが、河川・湖沼に棲息する水生生物への蓄積という視点で見ると不明な点が多く、十分な水質管理が行われているか明確になっていない。また、近年、河川・湖沼等の水環境において医薬品等の水質規制の対象となっていない化学物質（未規制化学物質）の一部が水生生態系に影響を与えていることが明らかになってきている。これまで、重金属等の規制物質については生物濃縮についての知見は見られるものの、医薬品等の未規制化学物質の生物濃縮に関する知見は少ない。水質（濃度）測定では検出されない物質であっても、生物濃縮により検出可能となる物質も考えられることから、生物濃縮による指標を加えた総合的な水質管理が必要である。

本研究は、水生生態系への影響が懸念されている医薬品類のなかから、広く一般細菌に対する殺菌剤として使用され、石鹼、シャンプー、歯磨き等に含有されている医薬部外品のトリクロサンをモデル物質として、水系食物連鎖における高次消費者の魚類への濃縮実態について検討した。

2. 研究方法

2. 1 生体試料中のトリクロサンの分析

生物試料（魚類）の分析前処理（抽出・精製）及び測定は、既往研究・調査報告等^{1)~8)}を参考に行った。抽出方法は、超音波抽出、高速溶媒抽出の2方法、精製方法はフロリジル、GPCの2方法について予備検討を行い、それぞれ回収率の高かった超音波抽出とフロリジル精製による方法とした（図-1 参照）。また、抽出・精製後の測定はGC-MSにより行った。GC-MSの測定条件を表-1に示す。本条件による検出下限値は 2.72ng/g-wet であった。生物試料（魚類）のトリクロサン分析は、スズキの食肉部位を用い、トリクロサンの添加回収試験（n=5）を行った。

2. 2 トリクロサンの水生生物濃縮実態

1) 下水処理水に曝露したメダカにおけるトリクロサンの蓄積と生物濃縮

本調査で用いた下水処理実験処理装置と流水式メダカ曝露水槽の配置を図-2に示す。下水処理実験装置は、最初沈殿池（500L）、活性汚泥処理槽（500L×4槽）、最終沈殿池（700L）、塩素混和池（100L）、担体処理槽（10L×4槽）から構成されている。流入下水は、主に生活排水が流入する実下水処理場の生下水を用

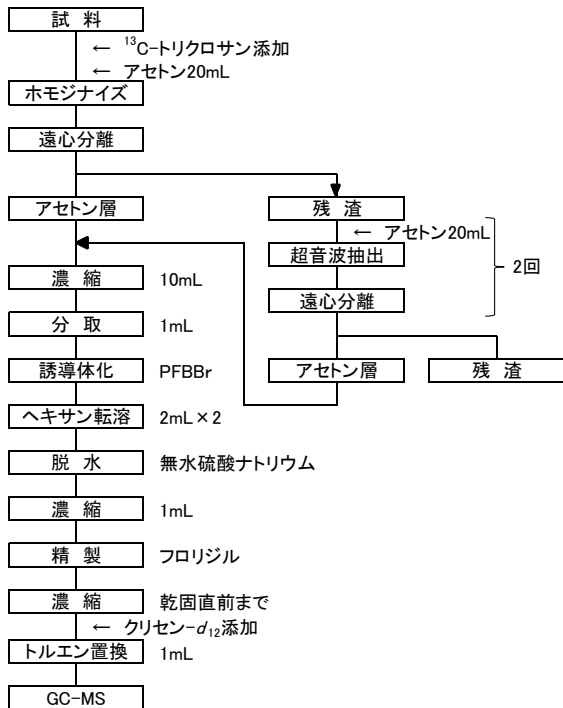


図-1 生体試料のトリクロロサン分析フロー

表-1 GC-MS の測定条件

GC条件		MS条件	
カラム	DB-17ms	イオン化方法	EI法
昇温条件	100°C(1min)→10°C/min →300°C(5min)	イオン化電圧	70eV
注入方法	スプリットレス	インターフェイス温度	280°C
注入口温度	270°C	イオン源温度	260°C
注入量	2μ L	検出モード	SIM
キャリアーガス	ヘリウム	定量イオン(m/z)	254
		確認イオン(m/z)	468

いた。活性汚泥槽は、第1槽から第4槽まで全面エアレーションを行う、活性汚泥法による処理とした。水理学的滞留時間(HRT)は7時間程度である。塩素混和池では、塩素接触時間30分程度で、塩素混和池の流出水で遊離残留塩素濃度が約0.1mg/Lとなるように、次亜塩素酸ナトリウム溶液を連続注入した。担体処理槽は、微生物が自然発生的に保持されたポリプロピレン製円筒担体(φ5mm,長さ5mm,厚さ1mm)が充填され、水理学的滞留時間2時間で二次処理水を処理した。メダカの曝露水は、二次処理水、二次処理水を塩素消毒した水(塩素消毒水)、二次処理水を担体処理した水(担体処理水)とし、対照区は脱塩素水道水とした。なお、各曝露水槽中の曝露水の溶存態トリクロロサン濃度を月1回測定した。

メダカの曝露は流水式とし、表-2の条件で行った。81日間の曝露終了後、各処理区で4~5匹を1匹毎に

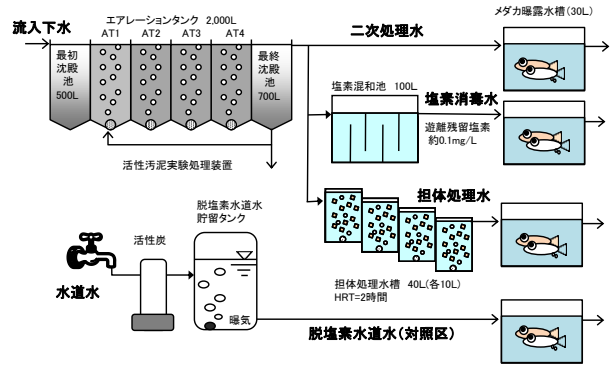


図-2 流水式メダカ曝露水槽

表-2 メダカ曝露条件

試験期間	H24.10.8~H24.12.28(81日間)
試験魚	d-rR系ヒメダカ(6~7カ月齢)
曝露匹数	(雄12匹+雌12匹)/曝露区
曝露方式	流水式
曝露水	脱塩素水道水(対照区) 二次処理水 塩素処理水 担体処理水
換水率	約5換水/日
水温	26°C(ヒータ制御)
照明	明期16時間/暗期8時間
給餌	飽食量 おとひめB2 4回/日(9:00,12:00,16:00,19:00)
曝気	あり

トリクロロサン分析に供した。卵の採卵は、曝露終了後6日前から始め、2日分を1検体とし、3検体分を採卵した。採卵の際は、受精卵と未受精卵に分けて採卵し、それぞれをトリクロロサン分析に供した。なお、生物試料(魚類)のトリクロロサン分析は、本研究で提案した方法(図-1)により行った。また、各処理水のトリクロロサン分析は、宝輪ら⁸⁾の方法を参考に抽出・濃縮・誘導体化等の前処理を行った後、GC/MSを用いて測定する方法とした。

2) 魚類種によるトリクロロサンの生物濃縮特性

ヒメダカ、ゼブラフィッシュの2魚種について実下水を流入水とする前述の活性汚泥処理実験装置の二次処理水(100%)と活性炭を通した脱塩素水道水で2倍に希釈した二次処理水(50%)、4倍に希釈した二次処理水(25%)、脱塩素水道水(Control)の4水槽で約2ヶ月間曝露した(図-3参照)。水温が23.7~29.0°C、平均25.4°Cの実験1(高水温期)と水温13.9~15.4°C、平均14.8°Cの実験2(低水温期)の2回実施した(図-4参照)。

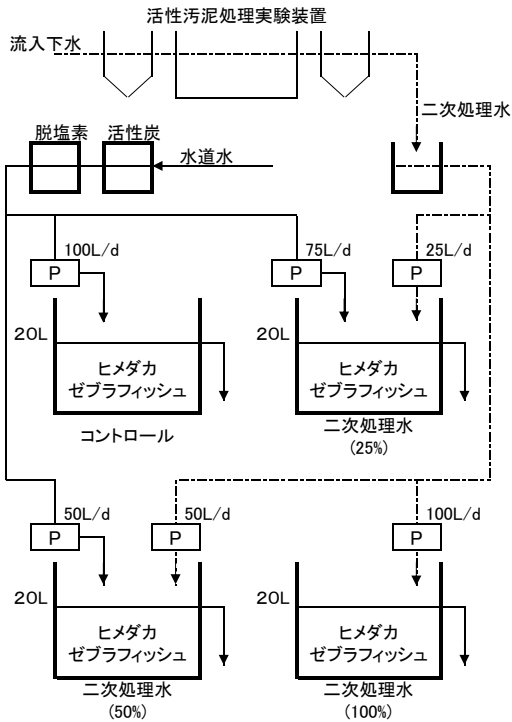


図-3 ヒメダカ、ゼブラフィッシュ曝露水槽

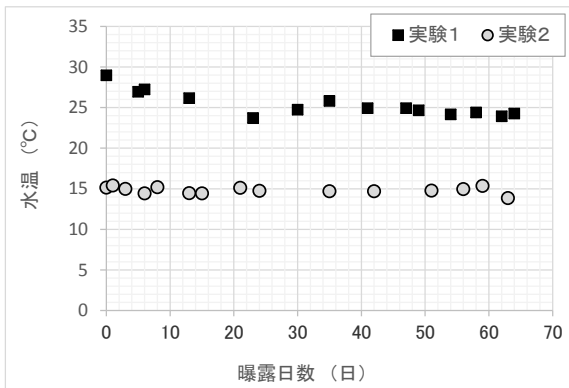


図-4 曝露水槽の水温変化

各曝露水槽は流水式とし換水率（約5換水/日）で行った。約2ヶ月間の曝露終了後、各水槽のヒメダカ2尾、ゼブラフィッシュ2尾のトリクロサン分析（GC/MS）と曝露期間中に数回各水槽のトリクロサン濃度を測定した。

生物試料（魚類）のトリクロサン分析は、図-1の方法を一部変更して行った。夾雑物質による妨害を軽減するため、フロリジル精製における第二画分の溶出を5%酢酸エチル/ヘキサンからジクロロメタン/ヘキサンに変更して行った。本法による装置検出下限値は0.22 ng/mL、試料量換算下限値は試料量1 g-wetで0.43 ng/g-wet、0.3 g-wetで1.5 ng/g-wetであった。また、n=3で再現性試験を行った結果、トリ

クロサンの平均回収率は102%、サロゲートの平均回収率は81%であり、それぞれのばらつき（CV）は0.66%、4.2%と良好な結果であった。また、水試料のトリクロサン分析は、宝輪ら³⁾の方法を参考に行った。ろ過試料にトリクロサン-¹³C₁₂を加え Oasis HLBを用い固相抽出した後、アセチル誘導体化しGC/MSにより分析した。

3) 実河川に生息する魚のトリクロサン濃縮実態

関東地方を流れる渡良瀬川の三国橋付近と小貝川の文巻橋付近において数種類の魚を捕獲してトリクロサン分析を行った。魚の捕獲は、魚種の特定はせず小型の魚を数種類捕獲することとした。渡良瀬川の三国橋、小貝川の文巻橋の2地点は、過年度に実施した全国河川の医薬品調査で他の地点に比べ比較的医薬品濃度が高い地点である。魚捕獲と平行して河川水中のトリクロサン分析を行った。

3. 研究結果

3. 1 生体試料中のトリクロサンの分析

抽出の予備検討は、超音波洗浄器（発振周波数：44KHz、超音波：320W、抽出時間：10分）による方法と高速溶媒抽出装置（抽出温度：100°C、抽出圧力：1500psi）による方法について各3試料行った。抽出操作における平均回収率は、超音波抽出が95.7%、高速溶媒抽出が77.4%であった。また、精製の予備検討は、フロリジルカートリッジ（Sep-Pak Plus Florisil）にトリクロサンを負荷した後、ヘキサン5mLの後に30%酢酸エチル/ヘキサン溶液10mLで溶出する方法とGPCによるトリクロサンの溶出が認められたフラクションを分析対象とする方法について各3試料行った。精製操作における平均回収率は、フロリジルが100%、GPCが89.5%であった。

以上の予備検討に基づき生物試料（魚類）を用いた分析確認は、図-1に示す分析フローに従いスズキの食肉部位を用いた添加回収試験（n=5）で評価した。添加回収試験は、スズキの食肉部位5gを遠沈管にはかりとり、トリクロサン100ngを添加して行った。GC-MSによる定量では、トリクロサン（PF化体）のマスマスペクトルを基に定量イオンをm/z 252、確認イオンをm/z 254に設定した。生物試料（魚類）の前

表-3 添加回収試験結果

	操作BL	無添加試料	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5
試料量 (g-wet)	—	5.0	5.1	5.0	5.1	5.0	5.0
添加量 (ng)	—	0	100	100	100	100	100
測定値 (ng/g-wet)	<2.7	<2.7	13.9	14.9	16.1	16.4	17.2
回収率 (%)	—	—	70.7	74.3	82.5	82.2	86.5

処理試料では、定量イオン (m/z 252) のトリクロサン (PFB 化体) ピークが生物試料由来と考えられる妨害の影響を受け過大評価された。このため、確認イオンとしていた m/z 254 を定量イオンに変更し、新たに m/z 468 を確認イオンとすることでトリクロサン (PFB 化体) ピークを得ることができた。スズキを用いた添加回収試験の結果を表-3 に示す。試験の結果、添加した試料からは平均 79.2% (CV8.2%) の回収が確認され、前処理全体を通じて、生物試料 (魚類) への適用が可能であると考えられた。

3. 2 トリクロサンの水生生物濃縮実態

1) 下水処理水に曝露したメダカにおけるトリクロサンの蓄積と生物濃縮

曝露期間中の各曝露水槽中のトリクロサン濃度を図-5 に示す。各曝露区の水中トリクロサン濃度は一定ではなかったが、水中トリクロサン濃度は、二次処理水で高いことがわかる。曝露中・後半は、塩素消毒水、担体処理水のトリクロサン濃度は近い値となっていた。図-6 に各曝露区の曝露終了後のメダカ生体中トリクロサン濃度を示す。二次処理水曝露区で雄、雌メダカともトリクロサン濃度が高くなった。

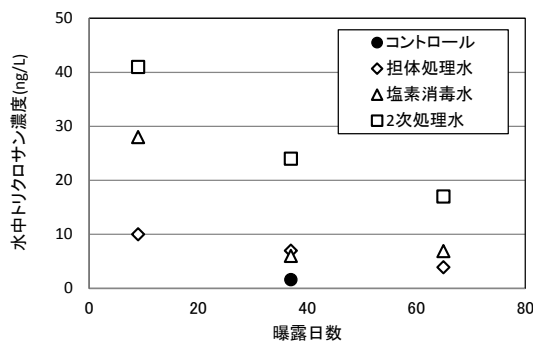


図-5 各曝露水のトリクロサン濃度

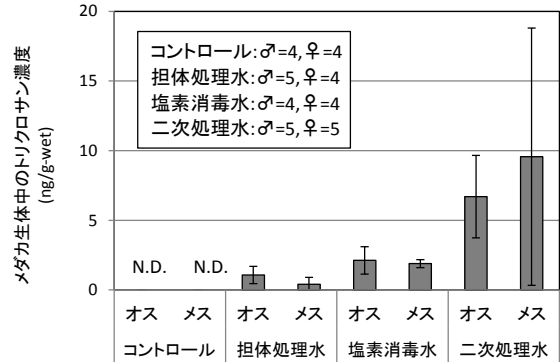


図-6 各曝露区の生体中のトリクロサン濃度 (エラーバー：標準偏差)

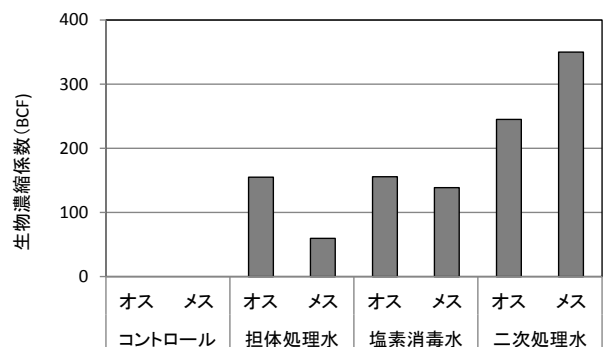


図-7 各曝露区のトリクロサン BCF

担体処理区での生体中のトリクロサン濃度は低かった。図-7 は、各曝露区の水中トリクロサン濃度と生体中トリクロサン濃度の平均値を用い、雄、雌毎に式 (1) から生物濃縮係数(BCF)を算出した結果である。

$$\text{生物濃縮係数(BCF)} = \frac{\text{生体中トリクロサン濃度 (ng/kg-wet)}}{\text{水中トリクロサン濃度(ng/L)}} \cdot (1)$$

トリクロサンの BCF は、メダカ雌の場合二次処理水 (約 350 倍)、塩素消毒水 (約 150 倍)、担体処理水 (約 100 倍) であり、100~350 倍となった。この値はトリクロサン純物質でのコイの濃縮試験結果で得られた BCF (2.7~469)⁹⁾ と概ね同等の値であった。

卵中のトリクロサンは、各処理水曝露区の未受精卵で検出され、その濃度は、担体処理水、塩素処理水、二次処理水の順で高くなった。また、二次処理水曝露区では受精卵でも検出された (図-8 参照)。

以上の結果から、トリクロサン濃度が低減された担体処理水に曝露したメダカ生体中のトリクロサン

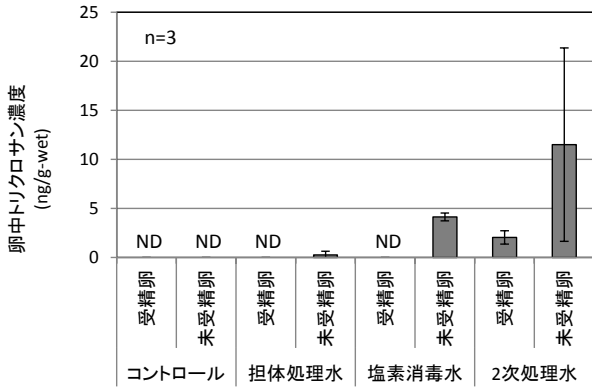


図-8 各曝露水の卵中のトリクロロサン濃度

(エラーバー：標準偏差)

濃度は二次処理水に比べ低いことから、担体処理によりメダカ体内蓄積および卵中濃度を低下できることがわかった。

2) 魚類種によるトリクロロサンの生物濃縮特性

曝露期間中の各水槽のトリクロロサン濃度は、二次処理水(100%)が 29~66ng/L(平均 44ng/L)、二次処理水(50%)が 12~36ng/L(平均 24ng/L)、二次処理水(25%)が 6.3~21ng/L(平均 13ng/L)であった。また、曝露終了後のヒメダカとゼブラフィッシュのトリクロロサン濃度と各曝露水槽のトリクロロサン濃度を用い前述の(1)式から生物濃縮係数(BCF)を算出し、その結果を図-9に示す。

トリクロロサンの BCF は、二次処理水(25%)曝露区・高水温期のヒメダカが平均 1,290、ゼブラフィッシュが平均 1,230 で低水温期のヒメダカが平均 980、ゼブラフィッシュが平均 750 であった。二次処理水(50%)曝露区では、高水温期のヒメダカが平均 1,090、ゼブラフィッシュが平均 600 で低水温期のヒメダカが平均 1,380、ゼブラフィッシュが平均 1,590 であった。二次処理水(100%)曝露区では、高水温期のヒメダカが平均 680、ゼブラフィッシュが平均 800 で低水温期のヒメダカが平均 1,210、ゼブラフィッシュが平均 930 であった。ヒメダカの BCF は 680~1,380、ゼブラフィッシュの BCF は 600~1,590 であり、コイ⁹⁾の BCF (2.7~469) に比べ少し高い値を示した。

本調査により得られたデータを低水温期と高水温期に分け、曝露水温とヒメダカ、ゼブラフィッシュの BCF の関係について検討したところ、曝露水温と

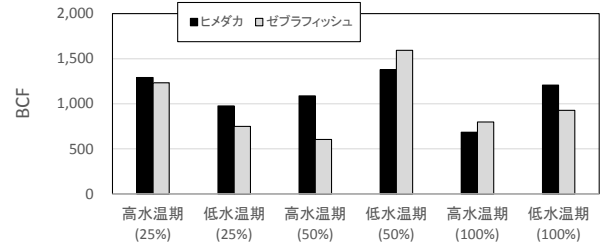


図-9 各曝露水槽における生物濃縮係数(BCF)

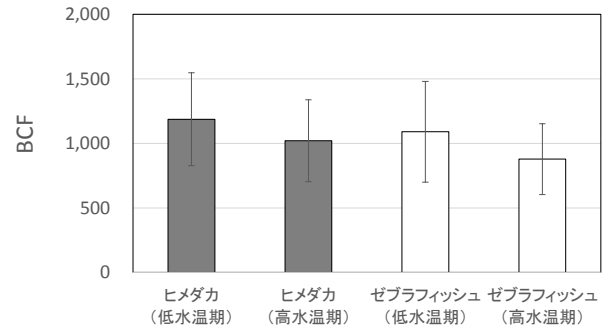


図-10 曝露水温と BCF の関係

(エラーバー：標準偏差)

BCF には有意な違いは見られなかった(図-10)。また、ヒメダカ、ゼブラフィッシュの肥満度(F)を次式(2)より求め、肥満度と BCF の関係を図-11に示す。弱い相関であるがヒメダカ、ゼブラフィッシュとも測定個体の肥満度が大きくなるに従い BCF が、小さくなる傾向がみられた。

$$F = W / L^3 \times 1000 \quad \dots (2)$$

ここに、F：肥満度、W：体重(g)、L：体長(cm)

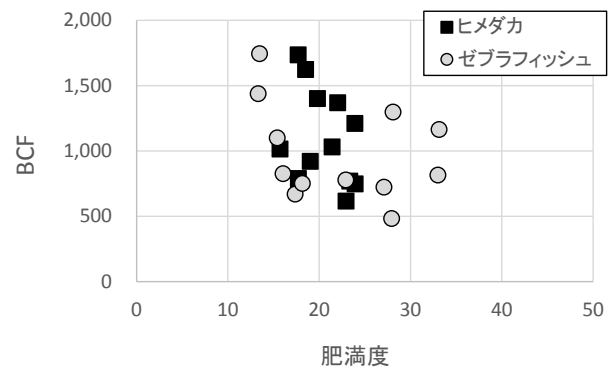


図-11 肥満度と BCF の関係

3) 実河川に生息する魚のトリクロロサン濃縮実態

渡良瀬川の三国橋、小貝川の文巻橋付近で捕獲した魚は 11 尾であり、体長 5cm~13cm の小魚である(表-4 参照)。捕獲魚のトリクロロサン濃度を捕獲地点の河

川水濃度と合わせて表-4 に示した。全 11 尾中、渡良瀬川で捕獲したヤマメ、小貝川で捕獲したヤマメ、モロコの 3 尾からトリクロサンが検出された。他の 9 個体は検出下限値以下であった。トリクロサンが検出された 3 尾について (1) 式から BCF を求めた。渡良瀬川で捕獲したヤマメは 360、小貝川で捕獲したヤマメは 700、モロコは 650 であり、コイの BCF (2.7~469)⁹⁾ と同等の値であった。

表-4 実河川に生息する魚のトリクロサン濃縮実態

	トリクロサン濃度		BCF	
	河川水 (ng/L)	生体(魚)試料 (ng/g-wet)		
渡良瀬川 (三国橋)	7.4	ヤマメ (9cm, 9g)	2.6	360
		モロコ (9cm, 9g)	<0.39	—
小貝川 (文巻橋)	2.2	ヤマメ-1 (9cm, 11g)	1.5	700
		ヤマメ-2 (8cm, 8g)	<0.40	—
		モロコ-1 (7cm, 6g)	<0.38	—
		モロコ-2 (7cm, 3g)	1.4	650
		クチボソ-1 (5cm, 1g)	<0.33	—
		クチボソ-2 (5cm, 1g)	<0.31	—
		フナ-1 (7cm, 11g)	<0.42	—
		フナ-2 (7cm, 10g)	<0.40	—
		オイカワ (13cm, 23g)	<0.41	—

4. まとめ

本研究により得られた結果を以下に示す。

1) 水生生物 (魚類) 試料のトリクロサン分析の前処理 (抽出・精製) について検討し、超音波抽出・フロリジル精製の後、GC-MS による測定方法を提案した。本方法による添加回収率は、スズキの食肉部位を用いた確認試験 (n=5) により、平均回収率 79.2%、CV8.2% が得られ、本方法は魚類試料への適用が可能であると考えられた。

2) 二次処理水、塩素消毒水、担体処理水にメダカを曝露し、メダカ生体中のトリクロサン分析からトリクロサンはメダカに蓄積することがわかった。その BCF は 100~350 倍であった。また、卵中のトリクロサン分析により卵への移行も確認された。トリクロサン濃度が低減された担体処理水に曝露したメダカ生体中のトリクロサン濃度は二次処理水に比べ

低いことから、担体処理によりメダカ体内蓄積および卵中濃度を低下できることがわかった。

3) 魚類種 (ヒメダカ、ゼブラフィッシュ) によるトリクロサンの生物濃縮特性について検討した結果、ヒメダカの BCF は 680~1,380、ゼブラフィッシュの BCF は 600~1,590 であり、これら 2 種の魚種間では大きく異なることはなかった。また、曝露水温により BCF には違いがみられなかった。

4) 渡良瀬川、小貝川の 2 河川において実河川に生息する魚のトリクロサン濃縮実態を調査した。捕獲魚全 11 尾中、トリクロサンが検出された 3 尾の BCF を求めたところ、渡良瀬川で捕獲したヤマメが 360、小貝川で捕獲したヤマメが 700、モロコが 650 であった。

参考文献

- 1) 田中宏明「河川水中で見出される医薬品の底質汚染の実態と生物影響に関する研究」平成 19 年度河川整備基金助成事業報告書、平成 20 年 6 月
- 2) 高田秀重ほか「東京湾におけるトリクロサン類の分布と動態」第 20 回環境化学討論会講演要旨集、2011
- 3) 要調査項目等調査マニュアル (水質、底質、生物)、平成 15 年
- 4) 吉岡敏行ほか「環境中超微量有害化学物質の分析・検索技術の開発に関する研究」岡山県環境保健センター年報、2007
- 5) 亀田豊「化粧品及び高分子製品由来の紫外線吸収剤の水環境中の汚染状況」第 18 回環境化学討論会講演要旨集、2009
- 6) 篠原竜一ほか「二枚貝を用いたアジア沿岸域の紫外線吸収剤汚染モニタリング」第 17 回環境化学討論会講演要旨集、2008
- 7) 松原英理子ほか「下水試料中医薬品の GC-MS(LRMS, MS/MS, HRMS)による分析検討」第 20 回環境化学討論会講演要旨集、2011
- 8) 宝輪勲ほか「GC-MS による水環境中の PPCPs 一斉分析法の基礎的検討」第 16 回環境化学討論会講演要旨集、2007
- 9) 環境省、化学物質の環境リスク評価第 7 巻 (<http://www.env.go.jp/chemi/report/h21-01/>)