

## ニトロアレーンの海産生物に及ぼす影響\*1

### Study on the effect of nitroarenes on marine organisms

隠塚 俊満\*2

Toshimitsu ONDUKA

**Abstract:** Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (NPAHs) are formed mainly by incomplete combustion of fossil fuels. Because NPAHs have become widely distributed in the environment, including aquatic systems, the toxicity of NPAHs to marine organisms has become a concern. Photo-induced toxicity occurs when the toxic effect of a chemical is induced or enhanced by visible or ultraviolet radiation; known photo-induced toxic chemicals include polycyclic aromatic hydrocarbons such as pyrene, which have molecular structures similar to NPAHs. The toxicity of NPAHs to marine organisms photo-induced by solar irradiation is therefore also a concern. To clarify the toxicity of NPAHs to marine organisms and to assess the current risk of exposure of marine organisms to NPAHs, the author determined the effects of NPAHs on marine organisms after taking into consideration the light environment. The effects considered in this study included toxic effects on survival, immobilization, growth, and reproduction.

The acute toxicities of 10 NPAHs were determined for marine organisms on three trophic levels: the diatom *Skeletonema costatum*, the herbivorous crustacean *Tigriopus japonicus*, and two species of fish, *Pleuronectes yokohamae* and the mummichog *Fundulus heteroclitus*. The relative toxicities of the NPAHs varied between the test species. A cholesterol pellet containing 1-nitronaphthalene or 1-nitropyrene was implanted into female mummichog, and the transfer of nitro-PAHs to the ovary was examined. The effectiveness of the pellet-implantation method was confirmed based on the transfer of NPAHs to the eggs in a pregnant fish. After pregnant mummichogs were so implanted, the effects on the hatchability of the eggs were recorded, as well as the survival and growth of the resulting larvae. Hatchability was the parameter most sensitive to the effects of both chemicals; chronic toxicity values based on the actual concentrations in the eggs in the test fish were determined. Irradiation with artificial light increased the acute toxicity to *T. japonicus* of 9 of the 10 NPAHs tested. The most phototoxic compound tested was 1-nitropyrene; its toxicity after irradiation with artificial light was more than 1000 times its toxicity in darkness. The phototoxicity of 1-nitropyrene was dependent primarily on the irradiation-induced production of ROS.

To determine the primary risk associated with exposure to NPAHs in the marine environment, the toxicity values or effect concentrations of NPAHs in the above tests were compared to reported concentrations of NPAHs in water. If the uncertainty of the chronic toxicity values and photo-induced toxicity are considered, then the conclusion is that the influence on marine organisms is rather small for four of the five NPAHs for which concentrations in water have been reported or estimated. The influence of 1-nitropyrene is a possible exception,

2017年10月30日受理 (Received on October 30, 2017)

\*1 鹿児島大学審査学位論文 (掲載に際し投稿規定に沿って一部修正した。鹿児島大学リポジトリより公表済 URL:<https://ir.kagoshima-u.ac.jp/>)

\*2 瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県廿日市市丸石 2-17-5

(National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, 2-17-5 Maruishi, Hatsukaichi, Hiroshima 739-0452, Japan)

because the predicted no-effect concentration determined in this study is similar to the reported concentration of this compound in water. This study has provided new information regarding risks to marine organisms from exposure to NPAHs.

**Key words:** Primary risk assessment, Photo-induced toxicity, Pellet-implantation method, Predicted no-effect concentration

## 目次

### 第1章 緒言

### 第2章 海産生物に対する急性毒性

#### 2.1 試料と方法

#### 2.2 結 果

#### 2.3 考 察

#### 2.4 まとめ

### 第3章 海産生物に対する慢性毒性

#### 3.1 試料と方法

#### 3.2 結 果

#### 3.3 考 察

#### 3.4 まとめ

### 第4章 海産生物に対する毒性の光照射による変化

#### 4.1 試料と方法

#### 4.2 結 果

#### 4.3 考 察

#### 4.4 まとめ

### 第5章 総合考察

### 謝 辞

### 文 献

## 第1章 緒言

### 1.1 研究の背景と目的

18世紀の産業革命以降、人類は莫大なエネルギーを消費することにより繁栄を謳歌している。人類が使用するエネルギーには様々な種類があり、代表的なものとして、石油、石炭、天然ガス等の化石燃料、水力、太陽光、風力等の再生可能エネルギー、原子力などが挙げられる。2012年に世界で使用された一次エネルギーは石油換算で127億トンであり、そのうち石油、石炭、天然ガス等の化石燃料は87%を占めている (BP public limited company, 2014)。日本においては、2011年3月に発生した東日本大震災以来、一次エネルギーに占める原子力の割合が減少して化石燃料への依存度はより高まっており、2012年度では一次エネルギーのうち化石燃料は92%を占めている (資源エネ

ルギー庁, 2014)。

莫大な量の化石燃料の使用は地球環境に様々な影響を及ぼしている。影響を及ぼしている一例として、酸性雨が挙げられる。酸性雨とは化石燃料の燃焼や火山の噴火などで発生する硫黄酸化物 ( $\text{SO}_x$ ) や窒素酸化物 ( $\text{NO}_x$ ) が雨や雪および霧に溶けることにより、通常より強い酸性を示す現象 (Likens and Bormann, 1974) で、1970年代から欧州や米国で問題になっており、近年では中国など新興国でも問題になりつつある (Larssen and Carmichael, 2000)。水域や土壌を酸性化して生態系に影響を及ぼし (Schindler, 1988)、森林生態系に直接影響を及ぼしている (Likens et al., 1996)。さらにはコンクリートを溶かし、金属を酸化して建造物に被害を与えている (Reisener et al., 1995)。

近年では地球温暖化についても注目が集まっている。この現象は人間活動による二酸化炭素 ( $\text{CO}_2$ ) やメタン ( $\text{CH}_4$ ) などの温暖化ガスの排出により、地球の大気や海洋の温度が長期的に上昇する現象である (IPCC, 2007a)。温度上昇による世界的な気象の変化、海面上昇による海岸線の侵食などにより様々な生態系への影響が危惧されている (Walther et al., 2002)。温暖化ガスとしては二酸化炭素、メタン、一酸化二窒素 ( $\text{NO}_2$ ) などが挙げられるが、二酸化炭素が温暖化に最も大きく寄与しており、この二酸化炭素濃度の上昇原因は主に化石燃料の使用が原因であるとされている (IPCC, 2007b)。このように化石燃料を使用する際に発生する副産物の環境影響については、使用する化石燃料の量が莫大であり、排出されるガスは国境を越えて移動するため、地球規模の問題に発展しやすい。また、前述のとおり、化石燃料の使用は人類の文明的な生活に大きく寄与しているため、すぐに使用を制限することが難しく、問題が長期化しやすい。そのため、これらの副産物の環境影響については優先的に検討し、問題がある場合は早期に問題提起しつつ、解決策を模索する環境を整える必要がある。

化石燃料の使用の際に発生する副産物の一種として、ニトロアレーン (NPAHs) が挙げられる。NPAHsは多環芳香族炭化水素 (PAHs) にニトロ

基が付加した化合物で、工場や自動車における化石燃料の燃焼 (Nielsen, 1984)、または大気中における一酸化窒素 (NO) とPAHsの反応により生成する (Atkinson and Arey, 1994)。NPAHsは主にPM 2.5などの粒子状物質に吸着されており、水域を含めた全ての環境に広く分布している (Bamford and Baker., 2003)。NPAHsの環境モニタリングは大気中濃度の調査例が多い (Bamford and Baker., 2003; Hasei, et al., 2006; Hayakawa et al., 1995; Kuo et al., 2003; Vasconcellos et al., 2008)。NPAHsは親化合物のPAHsとともに大気中に存在し、その一部は大気降下物、主に降雨によって水域環境に流入する。そのため、水域環境中における調査例では、限定的ではあるものの海の底質 (De Giorgio et al., 2010; Fernandez et al., 1992; Ozaki et al., 2010) や、河川水 (Ohe and Nukaya, 1996; Murahashi et al., 2001; Takahashi et al., 1995) および海水 (Murahashi et al., 2001) から検出されている。近年では大阪湾の二枚貝からNPAHsが検出され、ムラサキイガイおよびカキ中の濃度は合計濃度でそれぞれ2380-24,700および2670-26,000 pg/g dry weightと報告されている (Uno et al., 2011)。

NPAHsは強力な遺伝毒性物質であるベンゾ [a]ピレンと同等もしくはそれ以上の遺伝毒性を有し (Wislocki et al., 1986; Busby et al., 1988)、一部のNPAHsはサルモネラなどの細菌やラットなどのほ乳類に対して強い変異原性を示す (Tokiwa and Ohnishi, 1986; IPCS, 2003)。国際がん研究機関 (IARC: International Agency for Research on Cancer) はNPAHのうち1-ニトロピレンおよび6-ニトロクリセンの2種類をグループ2A、ヒトに対しておそらく発がん性があるグループに、11種類 (3,7-ジニトロフルオランテン, 3,9-ジニトロフルオランテン, 1,3-ジニトロピレン, 1,6-ジニトロピレン, 1,8-ジニトロピレン, 5-ニトロアセナフチレン, 3-ニトロベンズアントロン, ニトロフェン, 2-ニトロフルオレン, 1-(5-ニトロフルフリリデンアミノ)-2-イミダゾリジノン, 4-ニトロピレン) をグループ2B、ヒトに対して発がん性の可能性があるグループにそれぞれ分類している (IARC, 2014)。水生生物については、NPAHsの一種1-ニトロピレンの曝露により brown trout (*Salmo trutta*, Michelmores and Chipman., 1998) や mussel (*Mytilus edulis* L., Michelmores et al., 1998) にDNA損傷などの遺伝毒性が誘導され、また、7種NPAHsを添加した餌を用いた曝露により、マコガレイ marbled flounder (*Pleuronectes yokohamae*) に赤血球の異常などの

遺伝毒性が誘導された (Bacolod et al., 2013a)。6種NPAHsの marbled flounder に対する生物濃縮係数 (bioconcentration factors, BCF) が検討されており、BCFは4-422であり、検討した6種のNPAHsの中で1,8-ジニトロピレンが最も大きく、6-ニトロクリセンが最も小さい (Bacolod et al., 2013b)。水生生物に対する毒性影響については、NPAHsの一種1-ニトロナフタレンの fathead minnow (*Pimephales promelas*) に対する急性毒性は9.0 mg/Lと報告されている (Curtis and Ward, 1981)。このように、NPAHsは水域環境を含む全ての環境に広く分布し、水生生物を含む幅広い生物に対して遺伝毒性を有しており、化石燃料の使用の際に発生する副産物として新たに環境影響が懸念される物質群の一つと考えられる。

化学物質の水域環境に及ぼす影響を考える際には、水生生物に影響を及ぼす濃度、つまり毒性値から、水域生態系に影響を及ぼさないと推定される濃度、予測無影響濃度 (Predicted No Effect Concentration, PNEC) を推定し、これを化学物質の実測値または計算値から得られた予測環境中濃度 (PEC) と比較することでリスクを評価するのが一般的である (OECD, 2002)。また、本研究の被検物質であるNPAHsは工場や自動車における化石燃料の燃焼 (Nielsen, 1984)、または大気中における一酸化窒素 (NO) とPAHsの反応により生成する (Atkinson and Arey, 1994)。NPAHsは主にPM 2.5などの粒子状物質に吸着されており、その一部は大気降下物、主に降雨によって水域環境に流入し、最終的には沿岸海域に流入することが想定されるため、海洋生態系に及ぼす影響を検討することが重要である。しかし、NPAHsの水生生物に対する毒性に関する情報がほとんど見あらず、水域における環境影響評価するのに十分でない。さらに、環境中に放出された化学物質は環境中の物理的および化学的な作用に曝される。NPAHsと分子構造の近いピレン等のPAHsは紫外線照射により、最高一万倍以上海産生物に対する毒性が強まることが報告され (Pelletier et al., 1997)、これらの光毒性は活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) が主な原因と考えられている (Fu et al., 2012)。4-ニトロピレンなど一部のNPAHsは紫外線照射によりROSを発生した (Xia et al., 2013) ため、太陽光はNPAHsの環境影響に大きな影響を及ぼす可能性があり、光による毒性の変化を明らかにすることは、より精度の高い海産生物の影響評価に繋がる。

これらのことから、本研究では光条件を考慮したNPAHsの海産生物に対する毒性影響を明らかにし、

既報の環境中濃度と比較することで、現時点におけるNPAHsの海洋生態系への有害性初期評価を行うことを目標にした。

## 1.2 試験生物の選定

水域生態系には様々な生物が生息しており、生息する全生物に対する影響を検討するのは難しい。そのため、栄養段階の異なる生物、藻類、甲殻類(*Daphnia* sp.)、および魚類に対する急性および慢性毒性影響を検討し、評価することが推奨されている(OECD, 2002)。水生生物に対する化学物質の毒性試験法は、OECDのテストガイドライン、国際標準化機構(ISO)および米国材料試験協会(ASTM International)が定めた試験法、米国環境保護局(United States Environmental Protection Agency, U.S.EPA)などの各国政府が関係省庁で取りまとめた試験法が知られているが、これらの試験推奨種のほとんどは淡水の生物である。例えば、OECDテストガイドラインでは藻類の試験生物として淡水緑藻：*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus subspicatus*, 淡水珪藻：*Navicula pelliculosa*, 淡水藍藻：*Anabaena flos aquae*, *Synechococcus leopoldensis* (OECD, 2006a), 甲殻類の試験生物として*Daphnia magna* (OECD, 2004, 2008)がそれぞれ提案されている。魚類については急性毒性と慢性毒性で試験生物が若干異なり、急性毒性試験では淡水魚zebrafish (*Brachydanio rerio*), fathead minnow, common carp (*Cyprinus carpio*), ricefish (*Oryzias latipes*), guppy (*Poecilia reticulata*), bluegill (*Lepomis macrochirus*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), 慢性毒性試験では淡水魚zebrafish, fathead minnow, ricefish, rainbow troutがそれぞれ提案されている(OECD, 1992, 2013)。

本研究の被検物質であるNPAHsは主にPM2.5などの粒子状物質に吸着されており、その一部は大気降下物、主に降雨によって水域環境に流入し、最終的には沿岸海域に流入することが想定される。NPAHsの沿岸域への流入を考えると、淡水域のみならず沿岸生態系に対するリスク評価が重要である。また、淡水魚bluegillと海産魚tidewater silverside (*Menidia peninsulae*)の化学物質に対する感受性を比較すると多くの物質について海産魚の感受性が淡水魚よりも高い(Dawson et al., 1975-76)。マミチヨグMummichog (*Fundulus heteroclitus*)のナフタレンに対する感受性は塩分濃度の増加に伴い高くなる(Levitan and Taylor, 1979)。これらのことから、生

物に及ぼす影響と海産生物に及ぼす影響は異なる可能性が指摘されており(Leung et al., 2001)、海域における影響評価には海産生物に及ぼす影響を検討する必要がある。

日本では、水産庁が海産生物毒性試験指針を策定しており(水産庁, 2010)、この中で海産藻類としてスケルトネマ(*Skeletonema costatum*)が試験生物として推奨されている。国立環境研究所微生物系統保存施設ではスケルトネマの学名が*Skeletonema marinoidohrnii complex*に変更されているが、混乱を避けるため、この論文では*Skeletonema costatum*と表記する。

甲殻類では、急性毒性試験の推奨種としてシオダマリミジンコ(*Tigriopus japonicus*)、スジエビモドキ(*Palaemon serrifer*)、アシナガモエビモドキ(*Heptacarpus futuhirostris*)、クルマエビ(*Marsupenaeus japonicus*)が提案されており、シオダマリミジンコについては慢性毒性試験の一種である繁殖毒性試験の推奨種としても提案されている。魚類については急性毒性試験の推奨種としてマダイ(*Pagrus major*)、シロギス(*Sillago japonica*)が提案されているが、慢性毒性試験についてはマミチヨグ、ジャワメダカ(*Oryzias javanicus*)が推奨されている。

本研究ではこれらの推奨種の中で、試験生物としてスケルトネマ、シオダマリミジンコ、マミチヨグを選定した。スケルトネマはタラシオシラ目の海産珪藻で、日本沿岸でよく観察される種である。スケルトネマはASTM (1994), Standard Methods (APHA-AWWA-WPCF, 1998), U.S.EPA (1971, 1974)が提案した毒性試験法においても試験種として推奨されている。有機スズ化合物や船底塗料用防汚物質に対して珪藻の感受性が高く、その中でもスケルトネマの感受性が高いと報告されている(Fent, 1996; Onduka et al., 2010)。国立環境研究所微生物系統保存施設などで入手可能であり、入手した藻類株は瀬戸内海区水産研究所で継代培養し、試験に供することができる。

シオダマリミジンコはハルパクチクス目(harpacticoid)に属する底生性の海産カイアシ類であり、日本温帯域の沿岸満潮線より上にある潮だまりに生息し、塩分や水温等の環境変化に対して抵抗性の強い種である(高野, 1968)。シオダマリミジンコについては多くの重要なバイオマーカー遺伝子のシーケンズや、これらのバイオマーカーの有害化学物質暴露への応答が研究され、シオダマリミジンコが生態毒性機構解明のためのモデル生物としての適性を備えていると評価されている(Raisuddin et al., 2007,

Machida et al., 2002)。日本沿岸の潮だまりから採取可能であるが、系統による感受性の違いが考えられるため、シオダマリミジンコの系統が確立されている財団法人海産生物環境研究所から入手した。シオダマリミジンコは瀬戸内海区水産研究所で継代飼育し、ふ化後のノープリウス幼生を試験に供することができる。また、ノープリウス幼生は光を透過するため、光による毒性変化を顕著に反映しやすく、光照射による毒性変化を見る種として適している。

マミチヨグは北米東海岸原産のメダカ目広塩魚であり、水槽内での繁殖が可能で、受精卵から仔稚魚の飼育が容易な種である。マミチヨグの卵は卵膜を透して胚の発達が容易に観察できるため、発生過程も詳細に検討され (Armstrong and Child, 1965)、生殖生理についても詳細に検討されている (Shimizu, 1997)。また、マミチヨグについては生殖生理、毒性、遺伝学、生態などの多くの情報が集積されており、生態毒性に限らず、硬骨魚類のモデル生物としての適性を備えていると評価されている (Burnett et al., 2007)。マミチヨグは瀬戸内海区水産研究所で継代飼育しており、受精卵、稚仔魚を試験に供することができる。そのため受精卵からの曝露試験など慢性毒性影響を検討することができる。

また、NPAHsの動態を考慮するとNPAHsは海の底質に蓄積することが想定される。そのため、異体類などの底魚に対する毒性影響を検討することが重要である。毒性試験にはある程度まとまった尾数の入手が必要であることから、水槽内で繁殖可能な種を除くと種苗生産されている魚種が中心となる。日本国内で種苗生産されている異体類はヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) とマコガレイが主である (水産総合研究センター, 2014)。ヒラメは魚食性が強いのにに対してマコガレイは多毛類、甲殻類、二枚貝などを主な餌とするため、食物連鎖を通じた底質からの化学物質の影響を調査するための対象種として用いられている (Hashimoto et al., 2000)。マコガレイは試験を実施する瀬戸内海区水産研究所に近く、輸送時のストレスが少ないと想定される山口県下松市栽培漁業センターから稚魚を入手可能であり、同研究所で馴致飼育し、試験に供することができる。

海洋生態系において栄養段階の異なる藻類スケルトネマ、甲殻類シオダマリミジンコ、魚類マミチヨグおよびマコガレイに対するNPAHsの毒性影響を検討し、海洋生態系に及ぼす有害性を評価することで、我が国沿岸域の漁場環境保全に資することが可能になる。

### 1.3 被検物質の選定


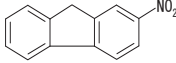
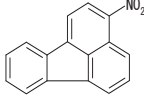
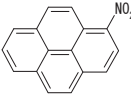
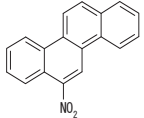
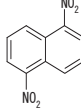
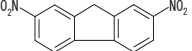
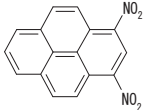
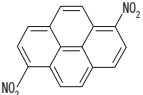
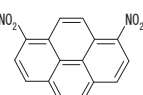
NPAHsには様々な種類が存在する。国際化学物質安全性計画 (IPCS: International Programme on Chemical Safety) により人の健康や環境へ与える影響についての評価書がまとめられているが、この中で65種類のニトロアレーンが取り上げられている (IPCS, 2003)。取り上げられた物質の中で、2-4環の芳香環を持つ物質が53物質を占めており、また、60物質がモノニトロ体かジニトロ体である。そのため、2-4環の芳香環を持つPAHsのモノニトロ体およびジニトロ体の毒性を検討すれば、主要なNPAHsの毒性を検討することができる。これらのことを考慮し、選定した被検物質をTable 1に示す。

ここで選定した4種の試験生物および10種類の被検物質により、急性毒性試験を実施し、急性毒性値を明らかにする。これらの毒性値を比較することにより、海産生物に対して強い毒性を示す物質を調べるとともに、試験生物による感受性の違いを明らかにする。また、急性毒性試験において顕著な毒性を示した物質について、魚類マミチヨグに対する慢性毒性試験を実施して慢性毒性値を明らかにする。シオダマリミジンコのノープリウス幼生を用いて光照射による毒性の変化を検討し、光毒性が顕著な物質を用いて、光分解物およびROSの発生の両面から検討することにより、光毒性の原因を検討する。これらの成果が得られることにより、光条件を考慮したNPAHsの海産生物に対する毒性影響を明らかにし、得られた毒性値からNPAHsのPNECを計算する。この値を既報の環境中濃度と比較することで、現時点におけるNPAHsの海洋生態系への初期リスク評価を行う。また、光照射による毒性変化の原因の一つを明らかにする。

## 第2章 海産生物に対する急性毒性

海産生物を含む水生生物を用いた毒性試験には高濃度で短期間の影響を調べる急性毒性試験と低濃度で長期間にわたる影響を調べる慢性毒性試験があるが、これらは水域環境における各種化学物質の影響評価に欠かせない試験法となっている。中でも急性毒性試験は試験期間が短く、比較的簡便であるため、これまでに種々の水生生物に対する各種化学物質の毒性影響が検討されている。日本においては、農薬登録の際、淡水の藻類、甲殻類および魚類に対する農薬の急性毒性試験結果を報告することが必須である (農林水産省、農薬取締法) など、化学物質の環境影響評価の重要な柱となっている。

**Table 1.** Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons used for toxicity tests (IPCS, 2003)

CAS No.	Chemical name	Molecular structure	Molecular weight	Melting point (°C)	Boiling point (°C)	Water solubility (mg/L, 25°C)	logK <sub>ow</sub>	IARC categories <sup>a</sup>
86-57-7	1-nitronaphthalene		173.17	58-61.5	312	9.18	3.19	3
607-57-8	2-nitrofluorene		211.22	154-158	326	0.216	3.37	2 B
13177-28-1	3-nitrofluoranthene		247.25	156-162	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	5.15	3
5522-43-0	1-nitropyrene		247.25	151-152	472	0.017	4.69	2 A
7469-02-8	6-nitrochrysene		273.29	208	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	5.41	2 A
605-71-0	1,5-dinitronaphthalene		218.17	215-219	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	2.58	- <sup>c</sup>
5405-53-8	2,7-dinitrofluorene		256.22	334	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	3.35	- <sup>c</sup>
75321-20-9	1,3-dinitropyrene		292.25	295-297	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	4.44	2 B
42397-64-8	1,6-dinitropyrene		292.25	309-310	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	4.44	2 B
42397-65-9	1,8-dinitropyrene		292.25	299-300	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	4.44	2 B

<sup>a</sup> Classification of the carcinogenic risk for humans by IARC (2014), <sup>b</sup> no data, <sup>c</sup> unclassified.

水生生物を用いた各種化学物質の毒性試験は主に淡水の生物を用いて実施されてきた。環境汚染が問題となった当初、汚染源のほとんどが工場排水であり、それが河川に排出されていたため、評価対象とした環境が河川や湖沼といった淡水域であったことに起因している。我が国では人口密集地域は沿岸域に分布しており、人間活動に伴う化学物質の沿岸環境への放出が想定され、また、河川に流出した化学物質は最終的に海に流入する。沿岸域の環境は漁業とも密接に関係

していることから、海産生物への各種化学物質の影響評価の重要性が高まっている。本研究の対象物質であるNPAHsは大気中に存在し、その一部は大気降下物、主に降雨によって水域環境に流入し、最終的には沿岸海域に流入する。そのため、ここでは海産の試験生物として選定した、海産藻類スケルトネマ、甲殻類シオダマリミジンコおよび魚類マコガレイおよびマミチヨグを用いて10種のNPAHsについての急性毒性試験を実施した。得られた毒性値を比較することにより、海

産生物に対して強い毒性を示す物質を調べるとともに、試験生物による感受性の違いを検討した。さらに、得られた急性毒性値を基に物質毎の予測無影響濃度 (Predicted No Effect Concentration, PNEC) を推定し、これらの値を報告された環境中濃度や環境モデルにより推定した環境中濃度と比較することにより、現時点におけるNPAHsの海洋生態系への初期リスク評価を行った。

## 2.1 試料と方法

### 2.1.1 被検物質および試験液

1-ニトロナフタレン, 2-ニトロフルオレン, 3-ニトロフルオランテン, 1,3-ジニトロピレン, 1,6-ジニトロピレン, 1,8-ジニトロピレン, 6-ニトロクリセン, およびフルオランテンはSigma-Aldrich (St. Louis, USA) から, 1,5-ジニトロナフタレン, 2,7-ジニトロフルオレン, および1-ニトロピレンは東京化成工業 (東京) から, ナフタレン, フルオレン, ピレン, およびクリセンは和光純薬工業 (大阪) から, それぞれ購入した。

被検物質の水溶解度が低いため, 溶解助剤としてジメチルスルホキシド (DMSO, plant cell culture tested, Sigma-Aldrich, St. Louis, 米国) を用いた。被検物質をDMSOでそれぞれ1-ニトロナフタレン100,000 mg/L, 1,5-ジニトロナフタレン2,000 mg/L, 2-ニトロフルオレン10,000 mg/L, 2,7-ジニトロフルオレン1,000 mg/L, 3-ニトロフルオランテン5,000 mg/L, 1-ニトロピレン5,000 mg/L, 1,3-ジニトロピレン200 mg/L, 1,6-ジニトロピレン100 mg/L, 1,8-ジニトロピレン100 mg/L, 6-ニトロクリセン500 mg/L, ナフタレン100,000 mg/L, フルオレン50,000 mg/L, フルオランテン50,000 mg/L, ピレン50,000 mg/L, クリセン1,000 mg/Lに調製し試験原液とした。これらの試験原液をf/2培地 (Guillard and Ryther, 1962) または砂, 活性炭およびガラス繊維ろ紙 (GFC filter, GE Healthcare, Little Chalfont, 英国) でろ過した海水 (以降ろ過海水と表記する) で希釈し, 試験液とした。なお, f/2培地はろ過海水から調製した。

予備試験で求めた藻類スケルトネマ, 甲殻類シオダマリミジンコ, および魚類マミチヨグならびにマコガレイに対するDMSOの10%致死濃度または10%影響濃度はそれぞれ5,900, 2,800, 8,300, および21,000  $\mu\text{L/L}$ であり, これらの濃度の5分の1未満の濃度を目安に助剤対照区のDMSO濃度を決定した。藻類生

長阻害試験, 甲殻類遊泳阻害試験, マミチヨグ急性毒性試験, マコガレイ急性毒性試験における助剤対照区のDMSO濃度はそれぞれ330, 500, 1,000, および2,000  $\mu\text{L/L}$ とした。

DMSO溶液を用いたNPAHs試験系では, 甲殻類および魚類の毒性試験において, 毒性値が得られたのは1-ニトロナフタレンのみであった。より多くの被検物質について毒性値を得てリスクを評価するため, 分散剤, 硬化ひまし油 (HCO-40, 日光ケミカルズ, 東京) の1:1混合液と試験系原液を用いた試験系についても検討した。これらの混合液をf/2培地またはろ過海水で希釈し, 試験液とした。甲殻類遊泳阻害試験およびマミチヨグ急性毒性試験における助剤対照区のDMSOおよびHCO-40の合計濃度はそれぞれ1,000および2,000  $\mu\text{L/L}$ とした。藻類生長阻害試験およびマコガレイ急性毒性試験では分散剤HCO-40がそれぞれ $<1$ および $<100$   $\mu\text{L/L}$ の濃度でスケルトネマの生長およびマコガレイの生残に影響を及ぼすため, 藻類生長阻害試験およびマコガレイ急性毒性試験では分散剤HCO-40を用いなかった。

### 2.1.2 試験生物

藻類の試験生物として, 多くの有害化学物質に対し高い感受性を示すことが知られている珪藻のスケルトネマを選定し, 国立環境研究所から分譲されたN-324株を試験に供した。500 mLガラス瓶にf/2培地300 mLを収容し, 培地中で継代培養した。培養にはグロースチャンバー (MLR-350, 三洋電機, 大阪) を用い, 照明には紫外線をカットした蛍光灯 (FL40S・N-EDL・NU, 松下電器産業, 大阪) を3本使用し, 明期14 h暗期10 h, 光合成光量子束密度40-80  $\mu\text{mol/m}^2/\text{sec}$ , 温度20°Cの条件で実施した。この培養液に含まれる藻類を後述する藻類生長阻害試験に用いた。

甲殻類の試験生物として, 財団法人海洋生物環境研究所から分譲されたシオダマリミジンコの親を瀬戸内海区水産研究所で継代培養し, 以降継代培養した生物を用いた。1 Lのガラス容器にろ過海水800 mLを収容し, 軽くエアレーションしながら, 明期14 h暗期10 h, 温度20°Cの条件で飼育した。餌としてf/2培地で培養したブラシノ藻の*Tetraselmis tetrathele*を餌として用い, 1日おきに $> 10^4$  cells/mLの培養液を5 mL添加した。この培養液から, ナイロン網地 (N-NO305T, 編み目サイズ48  $\mu\text{m}$ ; NB80, 編み目サイズ190  $\mu\text{m}$ ; NBCメッシュテック, 東京) を用い, ふ化後24時間未満のノープリウス期幼生を得た。ノープリウス期幼生は後述する甲殻類急性遊泳阻害試験に用

いた。

魚類の試験生物として、マミチヨグおよびマコガレイを用いた。マミチヨグは瀬戸内海区水産研究所で継代飼育しており、1 m<sup>3</sup>の水槽で水温22±2 °C（平均±標準誤差）、自然光条件下で飼育した。餌は配合飼料（C-1000、協和発酵工業、東京）を一日おきに与えた。マコガレイ稚魚を山口県下松市栽培漁業センターから入手し、水温14±3 °C、自然光条件下で数週間馴致飼育した。餌は配合飼料（おとひめC2、丸紅日清飼料、東京）を毒性試験開始前まで1日おきに与えた。マミチヨグのふ化仔魚（体重約1 mg）および体重73±21 mgのマコガレイを後述する魚類急性毒性試験に用いた。

### 2.1.3 藻類生長阻害試験

試験方法は奥村、隠塚（2010）の方法に準拠し、以下の方法で試験を行った。培養条件は継代培養と同条件で予備培養および72時間の試験を行った。試験容器にはφ24×200 mm、容量64 mLのネジ口試験管を用い、試験溶液は30 mLのf/2培地を用いた。試験原液として被検物質のDMSO溶液を使用し、試験時には助剤対照区を設けた。試験における初期細胞濃度は約10<sup>4</sup> cells/mLとし、各濃度3連で試験を行い、これを2つ繰り返した。被検物質濃度はTable 2およびTable 3に示すとおりであった。被検物質が析出した場合は滅菌したガラス繊維ろ紙（GFC filter, GE Healthcare）で試験液をろ過し、ろ液を試験に用いた。24時間毎に試験液を攪拌した後、藻類の生長を測定した。生長測定はターナー蛍光光度計（励起波長：340-500 nm、発光波長：>665 nm、model 10-AU-005, Turner Designs, Sunnyvale, 米国）を使用し、あらかじめ測定しておいたスケルトネマの細胞数と相対蛍光値の関係から各試験区の細胞数を推定し、生長曲線に基づいて生長速度を算出した。

### 2.1.4 甲殻類急性遊泳阻害試験

試験方法は堀（2010）の方法に準拠した。試験溶液2 mLをいれたガラス製秤量瓶（φ25×25mL、6 mL）に、幼生5個体/容器の割合で収容した4容器を1連とし、これを2つ繰り返した。被検物質濃度はTable 2およびTable 3に示すとおりであった。被検物質が析出した場合は滅菌したガラス繊維ろ紙（GFC filter, GE Healthcare）で試験液をろ過し、ろ液を試験に用いた。試験原液として被検物質のDMSO溶液またはDMSO溶液と硬化ひまし油HCO-40を1対1で

混合したものを使用し、試験時には、使用最高濃度と同量の助剤を添加した助剤対照区を設けた。試験溶液に幼生を収容後、暗条件、20°Cで24時間置いた後、遊泳阻害の判定を行った。判定は、容器内を緩やかにかき混ぜた後、付属肢を動かすことができても15秒間遊泳しないものを遊泳阻害とした。

### 2.1.5 魚類急性毒性試験

50 mLガラス製ネジ口三角フラスコに砂および活性炭でろ過した海水（以降活性炭ろ過海水と表記する）5 mLを収容し、試験原液を添加、攪拌した後、マミチヨグふ化仔魚を10尾ずつ収容し、96時間の試験を行った。試験原液として被検物質のDMSO溶液およびDMSO溶液と硬化ひまし油HCO-40と1対1で混合したものを使用し、試験原液の添加量は最高10 μLとした。20°Cに設定した恒温装置内に試験容器を収容し、止水式で試験を行った。

40 Lガラス製水槽に活性炭ろ過海水5 Lを収容し、試験原液を添加、攪拌した後、各水槽にマコガレイ稚魚（平均体重71 mg）を10尾ずつ収容し、96時間の試験を行った。試験原液として被検物質のDMSO溶液を使用し、試験時には、使用最高濃度と同量の助剤を添加した助剤対照区を設けた。試験原液の添加量は最高10 mLとし、止水式で試験を行った。いずれの試験においても被検物質濃度は、Table 4の濃度に設定し、試験は2連で行った。24時間ごとに死亡魚の有無を観察し、死亡魚は取り除いた。

### 2.1.6 被検物質測定

試験液中のNPAHs濃度の測定は以前報告された負イオン化学イオン化法（Negative Chemical Ionization, NCI）を用いた測定法（Albinet et al., 2006；Kawanaka et al., 2007）を海水用に改変して測定した。また、試験液中のPAHs濃度の測定は電子イオン化法（Electron Ionization, EI）を用いた測定法（環境庁環境保健部環境安全課、2000）を少ない液量で測定できるよう改変して測定した。

各試験開始時および終了時に採水した急性毒性試験の試験液をガラス繊維ろ紙（GFC filter, GE Healthcare）でろ過し、得られたろ液にサロゲート溶液50 μLを加えた後、ヘキササンで2回振とう抽出した。この抽出液を硫酸ナトリウムで脱水後、内部標準物質溶液50 μLを添加して窒素気流下で0.1または1 mLに濃縮し、GC-MSによる分析に供した。NPAHsの測定では、サロゲート溶液として、1-ニトロナフ



**Table 2.** Nominal and actual concentrations of 10 nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons tested in toxicity tests using an alga *Skeletonema costatum* and a crustacean *Tigriopus japonicus*

Organism dispersant	<i>S. costatum</i>		<i>T. japonicus</i>			
	-		+		-	
	Nominal concentration <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	Actual concentration <sup>b,c</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	Nominal concentration <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	Actual concentration <sup>b,d</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	Nominal concentration <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	Actual concentration <sup>b,d</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )
1-nitronaphthalene	700-2,800( $\sqrt{2}$ ) 700-2,800( $\sqrt{2}$ )	540-1,500(52-77) 290-1,600(39-68)	3,100-50,000(2) 3,100-50,000(2)	2,700-46,000(85-93) 2,300-51,000(74-101)	1,560-50,000(2) 1,560-50,000(2)	46-2,900(3.0-5.3) 140-3,200(5.1-8.8)
2-nitrofluorene	3,300 <sup>e</sup>	450(14) <sup>e</sup>	5,000 <sup>e</sup>	2,900(58) <sup>e</sup>	5,000 <sup>e</sup>	40(0.81) <sup>e</sup>
3-nitrofluoranthene	2.5-40(2) 2.5-40(2)	0.34-3.9(6.1-14) 0.29-5.5(6.6-14)	2,500 <sup>e</sup>	1,600(63) <sup>e</sup>	2,500 <sup>e</sup>	38(1.5) <sup>e</sup>
1-nitropyrene	2.0-8.0( $\sqrt{2}$ ) 2.0-8.0( $\sqrt{2}$ )	0.20-1.8(5.5-23) 0.21-1.5(5.9-18)	156-2,500(2) 156-2,500(2)	120-2,400(77-97) 110-3,200(71-130)	2,500 <sup>e</sup>	44(1.8) <sup>e</sup>
6-nitrochrysene	167 <sup>e</sup>	13(7.6) <sup>e</sup>	250 <sup>e</sup>	200(81) <sup>e</sup>	250 <sup>e</sup>	4.8(1.9) <sup>e</sup>
1,5-dinitronaphthalene	670 <sup>e</sup>	160(24) <sup>e</sup>	1,000 <sup>e</sup>	570(57) <sup>e</sup>	1,000 <sup>e</sup>	98(9.8) <sup>e</sup>
2,7-dinitrofluorene	330 <sup>e</sup>	27(8.1) <sup>e</sup>	500 <sup>e</sup>	120(24) <sup>e</sup>	500 <sup>e</sup>	16(3.2) <sup>e</sup>
1,3-dinitropyrene	67 <sup>e</sup>	3.5(5.2) <sup>e</sup>	6.25-100(2) 6.25-100(2)	2.1-65(33-65) 3.7-65(46-65)	100 <sup>e</sup>	2.0(2.0) <sup>e</sup>
1,6-dinitropyrene	33 <sup>e</sup>	0.28(0.86) <sup>e</sup>	3.13-50(2) 6.25-50(2)	0.08-19(2.5-48) 0.60-20(9.6-49)	50 <sup>e</sup>	0.84(1.7) <sup>e</sup>
1,8-dinitropyrene	33 <sup>e</sup>	0.44(1.3) <sup>e</sup>	3.13-50(2) 6.25-50(2)	0.13-25(4.2-60) 0.81-24(13-49)	50 <sup>e</sup>	1.6(3.1) <sup>e</sup>

- : toxicity test conducted without dispersant, + : toxicity test conducted with dispersant. <sup>a</sup> Values in parentheses are a geometric series with factors. <sup>b</sup> Values in parentheses are the percent concentration of the nominal concentration. <sup>c</sup> Average concentration shown is the geometric mean of actual concentrations at 0 and 72 h. <sup>d</sup> Average concentration shown is the geometric mean of actual concentrations at 0 and 24h. <sup>e</sup> Limit test was carried out at shown concentration.

**Table 3.** Nominal and actual concentrations of 5 polycyclic aromatic hydrocarbons tested in toxicity tests using an alga *Skeletonema costatum* and a crustacean *Tigriopus japonicus*

Organism dispersant	<i>S. costatum</i>		<i>T. japonicus</i>	
	-		+	
	Nominal concentration <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	Actual concentration <sup>b,c</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	Nominal concentration <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	Actual concentration <sup>b,d</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )
Naphthalene	30-3,000( $\sqrt{10}$ ) 30-3,000( $\sqrt{10}$ )	18-1,700(55-77) 13-1,500(43-51)	3,100-50,000(2) 3,100-50,000(2)	79-1,700(1.8-4.1) 140-2,500(3.6-7.8)
Fluorene	100-1,600(2) 100-1,600(2)	37-530(33-50) 41-360(22-41)	500-8,000(2) 500-8,000(2)	20-2,800(6.3-35) 11-1,600(2.2-20)
Fluoranthene	100-1,600(2) 100-1,600(2)	14-38(2.4-14) 16-54(3.4-16)	130-2,000(2) 130-2,000(2)	5.5-620(3.9-31) 1.1-240(0.89-12)
Pyrene	25-400(2) 25-400(2)	4.0-25(6.2-16) 1.9-9.1(2.3-7.6)	130-2,000(2) 130-2,000(2)	2.4-610(2.0-38) 3.3-600(2.6-30)
Chrysene	330 <sup>e</sup>	1.4(0.42) <sup>e</sup>	500 <sup>e</sup>	370(74) <sup>e</sup>

- : toxicity test conducted without dispersant. + : toxicity test conducted with dispersant.

<sup>a</sup> Values in parentheses are a geometric series with factors.

<sup>b</sup> Values in parentheses are the percent concentration of the nominal concentration.

<sup>c</sup> Average concentration shown is the geometric mean of actual concentrations at 0 and 72 h.

<sup>d</sup> Average concentration shown is the geometric mean of actual concentrations at 0 and 24 h.

<sup>e</sup> Limit test was carried out at shown concentration.

タレン- $d_7$ , 1,5-ジニトロナフタレン- $d_6$ , 2-ニトロフルオレン- $d_9$ , 1-ニトロピレン- $d_9$ , 6-ニトロクリセン- $d_{11}$ の1 mg/Lアセトン溶液を、内部標準物質とし

て、3-ニトロフルオランテン- $d_9$  の1 mg/Lヘキサソール溶液をそれぞれ用いた。また、PAHsの測定では、サロゲート溶液として、ナフタレン- $d_8$ , アントラセ

**Table 4.** Nominal and actual concentrations of 10 nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons tested in fish toxicity tests using *Pleuronectes*

Organism Dispersant	<i>P. yokohamae</i>		<i>F. heteroclitus</i>			
	-		+		-	
	Nominal concentration <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	Actual concentration <sup>b,c</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	Nominal concentration <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	Actual concentration <sup>b,c</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	Nominal concentration <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	Actual concentration <sup>b,c</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )
1-nitronaphthalene	250-4,000 (2) 250-4,000 (2)	220-2,100 (47-86) 200-2,100 (42-78)	1,500-24,000 (2) 1,500-12,000 (2)	130-3,500 (9-15) 160-1,500 (11-12)	500-8,000 (2) 500-8,000 (2)	150-2,400 (28-33) 270-4,800 (52-60)
2-nitrofluorene	20,000 <sup>d</sup>	150 (0.74) <sup>d</sup>	10,000 <sup>d</sup>	670 (6.7) <sup>d</sup>	10,000 <sup>d</sup>	4.6 (0.046) <sup>d</sup>
3-nitrofluoranthene	10,000 <sup>d</sup>	4.6 (0.046) <sup>d</sup>	500-4,000 (2) 500-4,000 (2)	8.0-230 (1.6-11) 2.4-230 (2.4-11)	5,000 <sup>d</sup>	0.10 (0.002) <sup>d</sup>
1-nitropyrene	10,000 <sup>d</sup>	16 (0.16) <sup>d</sup>	625-5,000 (2) 500-4,000 (2)	48-850 (4.3-17) 34-280 (2.7-6.9)	5,000 <sup>d</sup>	0.21 (0.0047) <sup>d</sup>
6-nitrochrysene	1,000 <sup>d</sup>	2.9 (0.29) <sup>d</sup>	500 <sup>d</sup>	3.3 (0.67) <sup>d</sup>	500 <sup>d</sup>	0.033 (0.007) <sup>d,e</sup>
1,5-dinitronaphthalene	4,000 <sup>d</sup>	64 (1.6) <sup>d</sup>	2,000 <sup>d</sup>	400 (20) <sup>d</sup>	2,000 <sup>d</sup>	38 (1.9) <sup>d</sup>
2,7-dinitrofluorene	2,000 <sup>d</sup>	6.1 (0.31) <sup>d</sup>	1,000 <sup>d</sup>	27 (2.7) <sup>d</sup>	1,000 <sup>d</sup>	0.86 (0.086) <sup>d</sup>
1,3-dinitropyrene	400 <sup>d</sup>	0.57 (0.29) <sup>d</sup>	200 <sup>d</sup>	83 (42) <sup>d</sup>	200 <sup>d</sup>	0.51 (0.25) <sup>d,e</sup>
1,6-dinitropyrene	200 <sup>d</sup>	0.56 (0.56) <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	4.4 (4.4) <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	0.11 (0.11) <sup>d,e</sup>
1,8-dinitropyrene	200 <sup>d</sup>	0.49 (0.49) <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	7.1 (7.1) <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	0.16 (0.16) <sup>d,e</sup>

- : toxicity test conducted without solvent, + : toxicity test conducted with solvent. <sup>a</sup> Values in parentheses are a geometric series with factors.

<sup>b</sup> Values in parentheses are the percent concentration of the nominal concentration. <sup>c</sup> Average concentration shown is the geometric mean of actual concentrations at 0 and 96h. <sup>d</sup> Limit test was carried out at shown concentration. <sup>e</sup> The concentration of chemical tested was set to half the detection limit because, at the end of the run, the test chemical was undetected in the test solution.

ン- $d_{10}$ , ピレン- $d_{10}$ , クリセン- $d_{12}$ の1 mg/Lアセトン溶液を、内部標準物質として、フルオレン- $d_{10}$ の1 mg/Lヘキサン溶液をそれぞれ用いた。

NPAHsの測定は、キャピラリーカラムHB 5-MS, 30 m, 0.25 mmID (Agilent Technologies, Santa Clara, 米国)を装着したGC/MS (Agilent, 6890N, 5975 inert; Yokogawa Analytical Systems, 東京)を用い、NCIで測定モードをSIM (Selective Ion Monitor)として測定した。注入口の温度は280℃とし、検出器の部分に290℃の温度をかけ、質量分析計のイオン源部分に240℃の温度を得た。カラム温度は100℃で2分間保持した後、20℃/分で200℃まで昇温、引き続き5℃/分で320℃まで昇温後、14分間保持した。分析時間は45分であった。また、PAHsの測定は、キャピラリーカラムDB 5-MS, 30 m, 0.25 mmID (Agilent Technologies)を装着したGC/MS (Agilent, 6890N, 5975 inert)を用い、EIで測定モードをSIMとして測定した。注入口の温度は280℃とし、検出器の部分に300℃の温度をかけ、質量分析計のイオン源部分に240℃の温度を得た。カラム温度は60℃で1分間保持した後、10℃/分で120℃まで昇温、引き続き5℃/分で210℃まで昇温後、6℃/分で300℃まで昇温し、5分間保持した。分析時間は50分であった。

モニターイオンはそれぞれ、1-ニトロナフタレン (127, 173), 1,5-ジニトロナフタレン (165, 211),

2-ニトロフルオレン (165, 211), 2,7-ジニトロフルオレン (163, 256), 3-ニトロフルオランテン (200, 292), 1-ニトロピレン (201, 247), 1,3-ジニトロピレン (200, 292), 1,6-ジニトロピレン (200, 292), 1,8-ジニトロピレン (200, 292), 6-ニトロクリセン (226, 273), 1-ニトロナフタレン- $d_7$  (180), 1,5-ジニトロナフタレン- $d_6$  (224), 2-ニトロフルオレン- $d_9$  (220), 3-ニトロフルオランテン- $d_9$  (256), 1-ニトロピレン- $d_9$  (256), 6-ニトロクリセン- $d_{11}$  (284), ナフタレン (128, 127), フルオレン (166, 165), フルオランテン (202, 200), ピレン (202, 200), クリセン (228, 226), ナフタレン- $d_8$  (136), フルオレン- $d_{10}$  (176), アントラセン- $d_{10}$  (188), ピレン- $d_{10}$  (212), クリセン- $d_{12}$  (240)とした。

試験開始時および終了時における試験液中の被検物質濃度の幾何平均を実測濃度とした (Table 2, 3, 4)。試験終了時において、試験液中の被検物質濃度が定量下限値未満の場合は、OECDガイドラインドキュメント (OECD, 2000)に沿って、定量下限値の半値を試験終了時の被検物質濃度と設定し、実測濃度を算出した (Table 4)。

**Table 5.** Mean acute toxicity concentrations (lower, upper confidence intervals) of 10 nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons tested on the alga *Skeletonema costatum*, the crustacean *Tigriopus japonicus*, and the fishes *Fundulus heteroclitus* and *Pleuronectes yokohamae*. Also shown are predicted no effect concentrations (PNEC) and predicted environmental concentrations (PEC) of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons.

Chemical	<i>S. costatum</i>		<i>T. japonicus</i>		<i>F. heteroclitus</i>		<i>P. yokohamae</i>	PNEC	PEC
	72-h EC50 (μg/L)		24-h EC50 (μg/L)		96-h LC50 (μg/L)		96-h LC50 (μg/L)	(ng/L)	(ng/L)
	-		+	-	+	-	-		
1-nitronaphthalene	1,200(1,100-1,400) 1,400(140-2,700)		4,800(3,700-6,300) 5,600(4,600-6,900)	600(470-760) 850(610-1,190)	560(490-640) 890(730-1,100)	1,100(870-1,390) 1,090(890-1,340)	830(630-1,060) 710(580-870)	5,600	11.7
2-nitrofluorene	>450		>2,900	>40	>670	>4.6	>150	>46	8.7
3-nitrofluoranthene	1.7(1.2-2.4) 2.5(1.8-3.9)		>1,000	>38	150(67-350) 190(73-510)	>0.10 <sup>a</sup>	>4.6	17	N.R.
1-nitropyrene	0.42(0.38-1.38) 0.64(0.52-0.84)		680(470-1,000) 700(550-870)	>44	290(160-520) 45(41-50)	>0.21	>16	4.2	1.0
6-nitrochrysene	>13		>200	>4.8	>3.3	>0.033 <sup>a</sup>	>2.9	>0.33	0.11
1,5-dinitronaphthalene	>160		>570	>98	>400	>38	>64	>380	10
2,7-dinitrofluorene	>27		>120	>16	>27	>0.86	>6.1	>8.6	N.R.
1,3-dinitropyrene	>3.5		14(10-19) 13(9.5-18)	>12	>83	>0.51 <sup>a</sup>	>0.57	130	N.R.
1,6-dinitropyrene	>0.28		3.3(2.1-5.2) 3.6(2.3-5.8)	>6.0	>44	>0.11 <sup>a</sup>	>0.56	33	N.R.
1,8-dinitropyrene	>0.44		4.1(2.3-7.4) 4.2(2.4-7.4)	>1.6	>7.1	>0.16 <sup>a</sup>	>0.49	41	N.R.

EC50, median effect concentration; LC50, median lethal concentration; -, toxicity values obtained from tests without a dispersant; +, toxicity values obtained from tests with a dispersant. PNECs were calculated by dividing the lowest value in our acute toxicity data by an assessment factor of 100. PECs are the highest reported concentrations including estimated concentration in river water and sea water. N.R.: not reported. <sup>a</sup>, the concentration of chemical tested was set to half the detection limit because, at the end of the run, the test chemical was undetectable in the test solution.

### 2.1.7 統計解析

藻類生長阻害試験における72時間の50%生長阻害濃度 (72-h EC50) は、対照区との生長速度 (1日あたり) 比較による生長阻害率および実測濃度からプロビット法により算出した。無影響濃度 (NOEC) は生長阻害率が対照区の値と統計的に有意差を示さない最も高い濃度とし、統計解析には一元配置分散分析およびその後のDunnnettの多重比較 ( $P < 0.05$ ) を用いた。プロビット法および多重比較の統計解析にはSPSS社のSPSS 14.0J for Windows regression softwareを用いた。

甲殻類急性遊泳阻害試験における24時間半数影響濃度 (24-h EC50) および魚類急性毒性試験における96時間半数致死濃度 (96-h LC50) はそれぞれ遊泳阻害率または死亡率と被検物質濃度からtrimmed Spearman-Kärber法 (Hamilton et al., 1977) により算出した。統計解析には米国環境保護庁が無償配布していたTrimmed Spearman-Kärber Program (Ver. 1.5) を用いた。

試験濃度の範囲で50%以上の藻類生長阻害、甲殻類遊泳阻害あるいは魚類死亡の認められない場合は、EC (LC) 50は試験最高濃度以上とした。

## 2.2 結果

### 2.2.1 NPAHs

毒性を検討したNPAHsのうち、藻類スケルトネマについては1-ニトロナフタレン、3-ニトロフルオランテン、および1-ニトロピレンの急性毒性値が得られ、それらの平均急性毒性値 (72-h EC50) はそれぞれ1300, 2.1, および0.53 μg/Lであった (Table 5)。その他のNPAHsについては、試験最高濃度までで50%以上の生長速度阻害が認められなかったため、急性毒性値を求めることができなかった。

甲殻類および魚類では、助剤を用いない系において、1-ニトロナフタレンのみ毒性値が得られた (Table 5)。甲殻類シオダマリミジンコについては、助剤を用いた系において、1-ニトロナフタレン、1-ニトロピレン、1,3-ジニトロピレン、1,6-ジニトロピレン、および1,8-ジニトロピレンの急性毒性値が得られ、それらの平均急性毒性値 (24-h EC50) はそれぞれ5,200, 690, 14, 3.5, および4.2 μg/Lであった (Table 5)。魚類マミチヨグについては、助剤を用いた系において、1-ニトロナフタレン、3-ニトロフルオランテン、および1-ニトロピレンの急性毒性値が得られ、それらの平均急性毒性値 (96-h LC50)

**Table 6.** Mean acute toxicity concentrations (lower, upper confidence intervals) of 5 polycyclic aromatic hydrocarbons tested on the alga *Skeletonema costatum*, the crustacean *Tigriopus japonicus*, and the fish *Fundulus heteroclitus*

Chemical	<i>S. costatum</i> 72-h EC50 ( $\mu\text{g/L}$ )	<i>T. japonicus</i> 24-h EC50 ( $\mu\text{g/L}$ )	<i>F. heteroclitus</i> 96-h LC50 ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>a</sup>
	-	+	+
Naphthalene	>1,700 1,300(1,100-1,700)	870(590-1,300) 930(120-7,100)	1700
Fluorene	490(470-510) >360	630(340-1,200) 540(320-890)	-
Fluoranthene	>54	15(9.2-25) 40(26-61)	-
Pyrene	>25	36(24-52) 21(14-33)	310
Chrysene	>13	>370	39

EC50, median effect concentration; LC50, median lethal concentration; -, toxicity values obtained from tests without a dispersant; +, toxicity values obtained from tests with a dispersant.

<sup>a</sup>, Kakuno et al., 2006.

はそれぞれ730, 170, および170  $\mu\text{g/L}$ であった (Table 5)。その他のNPAHsについては、試験最高濃度までで50%以上の遊泳阻害あるいは死亡が認められなかったため、急性毒性値を求めることができなかった。

助剤を用いない試験系で今回得られた藻類に対する平均急性毒性値を比較すると、スケルトネマに対しては1-ニトロピレンが最も強い毒性 (72-h EC50 : 0.53  $\mu\text{g/L}$ ) を示した (Table 5)。助剤を用いた系で今回得られた平均毒性値を比較すると、シオダマリミジンコに対しては1,6-ジニトロピレン (24-h EC50 : 3.5  $\mu\text{g/L}$ ) が、マミチヨグに対しては3-ニトロフルオランテンおよび1-ニトロピレン (96-h LC50 : 170  $\mu\text{g/L}$ ) が、それぞれ強い毒性を示した (Table 5)。シオダマリミジンコおよびマミチヨグについては、助剤を用いる系と用いない系両方において、1-ニトロナフタレンの急性毒性値が得られた。助剤を用いた系におけるシオダマリミジンコおよびマミチヨグに対する平均毒性値 (24-h EC50 : 5,200  $\mu\text{g/L}$ および96-h LC50 : 730  $\mu\text{g/L}$ ) は、助剤を用いない場合 (24-h EC50 : 730  $\mu\text{g/L}$ および96-h LC50 : 1,100  $\mu\text{g/L}$ ) のそれぞれ8倍および半分程度であった (Table 5)。1,5-ジニトロナフタレンおよび2,7-ジニトロフルオレンについては、試験した濃度の範囲内ではいずれの試験生物に対しても毒性値は得られなかった (Table 5)。

## 2.2.2 PAHs

毒性を検討したPAHsのうち、藻類スケルトネマについては、ナフタレンおよびフルオレンの急性毒性試験を2回検討したうち、それぞれ1回のみ急性毒性値が得られ、それらの72-h EC50はそれぞれ1,300および490  $\mu\text{g/L}$ であった (Table 6)。その他のPAHsについては、試験最高濃度までで50%以上の生長速度阻害が認められなかったため、急性毒性値を求めることができなかった。

甲殻類シオダマリミジンコについては、助剤を用いた系において、ナフタレン、フルオレン、フルオランテン、およびピレンの急性毒性値が得られ、それらの平均急性毒性値はそれぞれ900, 590, 28, および29  $\mu\text{g/L}$ であった (Table 6)。その他のPAHsを用いた試験では、設定可能な最高濃度試験区においても、半数以上の生物に遊泳阻害が認められなかった (Table 6)。

## 2.3 考 察

本研究では、栄養段階の異なる海産生物、すなわち、藻類スケルトネマ、甲殻類シオダマリミジンコ、魚類マミチヨグおよびマコガレイに対する10種類NPAHsの急性毒性を明らかにした。助剤を用いる系と用いない系両方において、シオダマリミジンコおよびマミチヨグに対する1-ニトロナフタレンの急性毒性値が得られたものの、急性毒性値はシオダマリミジンコに対しては大きくなり、マミチヨグに対しては小さくなった (Table 5)。そのため、助剤添加による1-ニトロナフタレンの毒性への影響について、一定の傾向は認められなかった。

NPAHsの水生生物に対する急性毒性に関する論文はほとんど見あたらないが、1-ニトロナフタレンの影響については若干報告例がある。1-ニトロナフタレンのfathead minnowに対する毒性値96-h LC50 (半止水式暴露試験における設定濃度を基にした値) は9.0 mg/L (Curtis and Ward, 1981) であり、この濃度は今回得られた魚に対する設定濃度を基にした毒性値 (1,900-4,600  $\mu\text{g/L}$ ) および実測濃度を基にした毒性値 (560-1,100  $\mu\text{g/L}$ ) より高かった。また、1-ニトロナフタレンの淡水の繊毛虫の一種であるCiliate (*Tetrahymena pyriformis*) に対する毒性値IGC50 (50% impairment growth concentration, 止水式暴露試験における設定濃度を基にした値) は17.3 mg/L (Schultz and Moulton, 1985) であり、この濃度は今回得られた甲殻類に対する設定濃度を基にした毒性値

(13,000-24,000  $\mu\text{g/L}$ ) とほぼ同等であった。そのため、シオダマリミジンコとCiliateの感受性はほぼ同等であると推測された。

藻類スケルトネマに対する毒性値をPAHsとニトロ基が導入されたNPAHsにおいて比較した結果、ナフタレンについてはナフタレンおよび1-ニトロナフタレンの72-h EC50がそれぞれ1,300-1,700および1,200-1,400  $\mu\text{g/L}$ となり (Table 5, 6), 毒性値はほぼ同等であった。フルオランテンについてはフルオランテンおよび3-ニトロフルオランテンの72-h EC50がそれぞれ>54および1.7-2.5  $\mu\text{g/L}$ となり (Table 5, 6), ニトロ基が導入されると毒性値が20分の1未満となり, 毒性が顕著に強まった。ピレンについてはピレン, 1-ニトロピレン, およびジニトロピレン類の72-h EC50がそれぞれ>25, 0.42-0.64および>0.28->0.44  $\mu\text{g/L}$ となり (Table 5, 6), ニトロ基が1基導入されると毒性値は40分の1未満になり, 毒性が顕著に強まったが, ニトロ基が2基導入されると毒性値は算出できなかった (Table 5)。

甲殻類シオダマリミジンコに対する毒性値をPAHsとそれぞれのPAHsにニトロ基が付加した物質において比較した結果, ナフタレンについてはナフタレンおよび1-ニトロナフタレンの24-h EC50がそれぞれ870-930および4,800-5,600  $\mu\text{g/L}$ となり (Table 5, 6), ニトロ基が付加すると毒性値が5倍程度大きくなり, 毒性が弱まった。ピレンについてはピレン, 1-ニトロピレン, およびジニトロピレン類の24-h EC50がそれぞれ21-36, 680-700および3.3-14  $\mu\text{g/L}$ となり (Table 5, 6), ニトロ基が1基導入されると毒性値は20-30倍程度大きくなり, 毒性が顕著に弱まったが, ニトロ基が2基導入されるとピレンよりも2分の1から8分の1倍程度小さくなり, 毒性が強まった。

魚類マミチヨグについては, 角埜ら (2006) が報告したPAHsのマミチヨグに対する毒性値と比較を行った。ナフタレンについてはナフタレンおよび1-ニトロナフタレンの96-h LC50がそれぞれ1,700および560-890  $\mu\text{g/L}$ となり (Table 5, 6), ニトロ基が付加しても毒性値は倍程度の違いしかなく, ニトロ基付加による毒性の顕著な変化は認められなかった。ピレンについてはピレン, 1-ニトロピレン, およびジニトロピレン類の96-h LC50がそれぞれ310, 45-290および>4.4->83  $\mu\text{g/L}$ となり (Table 5, 6), ニトロ基が1基導入されても毒性値はほぼ同等でありニトロ基付加による毒性の顕著な変化は認められず, ニトロ基が2基導入されると毒性値は算出できなかった。これらのことから, ニトロ基の導入による急性毒性の変化は試験

生物によって異なり, 一定の傾向は認められなかった。

また, 参考として他の物質との毒性比較を行った。有機スズ化合物群 (OTs) は環境生態系に及ぼす影響が大きく, 日本を含めた多くの国でここ20年以上厳しく使用が規制されている。OTsの中で最も強い毒性を示す物質と考えられているトリブチルスズ (Fent, 1996) の藻類スケルトネマ, 甲殻類シオダマリミジンコ, 魚類マミチヨグに対する毒性値はそれぞれ0.33-0.36  $\mu\text{g/L}$  (1.0-1.1 nmol/L, Walsh et al. 1985),  $5.2 \pm 0.5 \mu\text{g/L}$  ( $14 \pm 2$  nmol/L, 堀ら, 2001), および17.2-23.8  $\mu\text{g/L}$  (59-82 nmol/L, Bushong et al., 1988; Pinkney et al., 1989) と報告されている。そのため, 海産生物の種類によっては, 数種のNPAHsはトリブチルスズと同程度の強い毒性を示すと考えられた。

1-ニトロナフタレン, 3-ニトロフルオランテン, 1-ニトロピレン, 1,3-ジニトロピレン, 1,6-ジニトロピレン, 1,8-ジニトロピレンの急性毒性値は一部の試験生物に対して1 mg/Lを下回っており, OECDクライテリアによる最も強い毒性を示す物質群 (Acute I) に分類された (OECD, 2001)。1-ニトロナフタレンのfathead minnowに対する毒性値 (半止水式暴露試験における設定濃度を基にした値) は9.0 mg/L (Curtis and Ward, 1981) であり, この濃度は今回得られた魚に対する設定濃度 (1,900-4,600  $\mu\text{g/L}$ ) および実測濃度 (560-1,100  $\mu\text{g/L}$ ) を基にした毒性値より高かった。分散剤を用いない系における, 1-ニトロナフタレンのマコガレイに対する影響はマミチヨグに対する影響と同程度であった (Table 5)。

本研究で得られた結果を用いてNPAHsのリスク評価を以下に試みた。得られた急性毒性値を用いてPNECを推定した。報告されたNPAHsの水生生物に対する急性毒性値のうち, 今回得られた急性毒性値より小さい毒性値は見あたらず, 今回得られた毒性値からPNECを推定した。今回毒性試験を実施した10種類のNPAHsについて, 今回得られた急性毒性値の中で最も小さい毒性値をOECDが推奨する評価係数100 (OECD, 2002) で割り, 各NPAHsのPNECを推定した (Table 5)。

河川中および海水中における1-ニトロピレンの最高検出濃度はそれぞれ淀川において1,000 pg/L (4,000 fmol/L, Ohe and Nukaya, 1996) および日本海において0.5 pg/L (2 fmol/L, Murahashi et al., 2001) と報告されている。環境動態モデルを用いて, Yaffe et al. (2001) はカリフォルニア地域の水 (環境モデルにおける水であり, 海水や河川水などに区別されてい

ない)の1-ニトロピレン濃度を2.9 ng/Lと推定した。Huang and Batterman (2014)は環境動態モデルを用いて、ミシガン湖水中の1-ニトロピレン濃度を0.17 ng/Lと推定した。今回推定した1-ニトロピレンのPNECは4.2 ng/Lであり、この値は上記カリフォルニア地域の推定された水中濃度に近い濃度であった。そのため、1-ニトロピレンは海産生物に影響を及ぼす可能性が想定され、この物質の海洋環境に関するリスクについてさらに研究を進めていく必要がある。

日本における1-ニトロナフタレンおよび1,5-ジニトロナフタレンの河川中濃度はそれぞれ3.7 ng/Lおよび10 ng/Lと報告されている(高橋ら, 1995)。Yaffe et al. (2001)は環境動態モデルを用いてカリフォルニア水中の1-ニトロナフタレンおよび2-ニトロフルオレン濃度をそれぞれ1.0 ng/Lおよび2.2 ng/Lと推定した。また、Huang and Batterman (2014)は環境動態モデルを用いて、ミシガン湖水中の1-ニトロナフタレン、2-ニトロフルオレン、6-ニトロクリセン濃度をそれぞれ11.7 ng/L, 8.7 ng/L, および0.11 ng/Lと推定した。今回推定した1-ニトロナフタレン、2-ニトロフルオレン、1,5-ジニトロナフタレン、および6-ニトロクリセンのPNECはそれぞれ5,600 ng/L, >46 ng/L, >380 ng/L, >0.33 ng/Lであり、これらのNPAHsの報告された環境水中濃度の少なくとも3倍以上であった。2-ニトロフルオレン、1,5-ジニトロナフタレン、および6-ニトロクリセンについては何れの急性毒性試験においても、試験濃度の範囲で50%以上の藻類生長阻害、甲殻類遊泳阻害あるいは魚類死亡が認められず、急性毒性値を試験最高濃度以上として算出しているため、PNECを低く推定していると考えられる。しかし、実測および推定された環境水中濃度はこれらのPNECを下回っており、これらのNPAHsは環境水中濃度では海産生物に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。3-ニトロフルオランテン、2,7-ジニトロフルオレン、1,3-ジニトロピレン、1,6-ジニトロピレン、および1,8-ジニトロピレンの環境水中濃度は報告されておらず、これらの物質の海産生物に及ぼす影響を評価することはできなかった。

## 2.4 まとめ

本章においては、NPAHsの沿岸海洋生態系への影響評価に資することを目的として、各栄養段階の海産生物、即ち、海産藻類スケルトネマ、甲殻類シオダマリミジンコ、および魚類マコガレイおよびマミチヨグを用いて10種のNPAHsについての急性毒性試験を実施した。

急性毒性試験の結果、10種のNPAHsのうち、藻類については3種、甲殻類については5種、魚類マミチヨグについては3種、マコガレイについては1-ニトロナフタレンのみ、それぞれ急性毒性値が得られた。その他の被験物質を用いた試験では、設定可能な最高濃度試験区においても、藻類の試験では生長速度の半減まで至らず、また、その他の試験では半数以上の生物に影響が認められなかった。NPAHsの急性毒性値とNPAHsと対応するPAHsの急性毒性値を比較した結果、ニトロ基の導入による毒性の変化は試験生物によって異なり、一定の傾向は認められなかった。報告されたNPAHsの水生生物に対する急性毒性値を考慮しつつ、本研究で得られた急性毒性値を用いて各物質のPNECを推定し、それらのリスク評価を行った。推定したPNECと報告された環境水中濃度を比較した結果、1-ニトロピレンについてはPNECと報告された環境水中濃度が近接しており、現在の環境水中濃度においても海産生物に影響を及ぼす可能性が想定された。1-ニトロナフタレン、2-ニトロフルオレン、1,5-ジニトロナフタレン、および6-ニトロクリセンのPNECが、報告された環境水中濃度より少なくとも3倍以上高く、これらのNPAHsは現在の環境水中濃度で海産生物に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。また、その他の5物質については環境水中濃度が報告されておらず、これらの物質の海産生物に及ぼす影響を評価することはできなかった。

本研究の対象物質であるNPAHsは強い変異原性や発がん性を示す物質も多いため、海産生物に対する慢性影響を見ることが重要である。魚類を用いた慢性毒性試験では対照区の成長や生残などの指標を一定水準以上に維持させるため、流水式で曝露する必要がある。この点については次章で検討する。

## 第3章 海産生物に対する慢性毒性

近年では公害が社会問題となっていた頃に比較して、高濃度の化学物質が河川等に流出し、魚など水生生物の大量斃死等が起きることはほとんどなくなってきている。そのため、より低い濃度での化学物質の生物影響や、沿岸域を中心とした海域の環境評価が着目されるようになり、急性毒性試験のみならず海産生物を用いた慢性毒性試験の重要性が増してきている。第2章で示したように、NPAHsの水中濃度は低く、急性毒性試験結果から推定した各NPAHsのPNECと比較すると、1-ニトロピレンを除いてほとんどリスクのないことが推測された。しかし、慢性毒性試験結果との比較によるリスクが不明であり、1-ニトロピレ

ンを含むNPAHsの慢性毒性試験実施が必要である。また、本研究の対象物質であるNPAHsは強い変異原性や発がん性を示す物質も多いため、その毒性を考えると海産生物に対する慢性影響を見る必要があるとあり、特に奇形発症などの観察が可能な初期生活段階毒性試験の実施が必要である。

藻類については、微細藻類を用いた急性毒性試験において、試験期間中に微細藻類が世代交代を行っており、急性毒性試験を行うことにより、急性および慢性毒性値を算出することが可能である。淡水の藻類ではウキクサを用いた慢性毒性試験が提案されている (OECD, 2006b)。甲殻類についてはOECDのテストガイドライン等において淡水産ミジンコの一種、オオミジンコ (*Daphnia magna*) を用いた繁殖阻害試験法が確立されており (OECD, 2008)、広く実施されている。海産甲殻類を用いた慢性毒性試験としてはシオダマリミジンコを用いた繁殖阻害試験法が報告されている (高久, 2010) もの、シオダマリミジンコを用いた慢性毒性試験の報告例は限られている (Marcial et al., 2003; Lee et al., 2008)。

魚類では慢性毒性試験が比較的早期に確立されており、広く実施されている (OECD, 2013)。魚類の慢性毒性試験である全生活環毒性試験に用いられる試験魚の代表として、コイ目の淡水魚fathead minnowがよく知られている。全生活環毒性試験は受精卵から成魚にいたるまでの全生活環を通して試験を続けるもので、このfathead minnowを試験魚として用いる場合には、試験期間は約300日を要することが知られている (Rand et al., 1995)。このように、慢性毒性試験の実施には急性毒性試験に比較して時間がかかることから、より簡便な手法が求められるようになり、特に感受性が高いふ化から稚魚期を含む初期生活段階に限定して試験を実施する初期生活段階毒性試験がOECDのテストガイドライン210 (OECD, 2013) に定められ、本手法であれば2か月程度の試験により慢性影響を評価することができる (Rand et al., 1995) ようになった。また、漁網防汚剤、船底塗料あるいは流出油等の汚染問題を契機に、各種化学物質の水生生物に与える影響の評価対象範囲も淡水域から沿岸域から海域へと広がってきており、海域における汚染物質の慢性影響評価の重要性も高まっている (Hutchinson et al., 1994; Ward et al., 1981; OECD, 1998)。しかし、日本産の海水魚についてはその仔稚魚期飼育の困難さから、慢性影響を評価するためのより簡便な試験法である初期生活段階毒性試験にさへ供する試験魚は見当たらない。そのため、海産魚では北米原産のマミチヨグを用いた初期生活段階毒性試験が提案されている

(角埜, 2010)。

魚類を用いた慢性毒性試験では対照区の成長や生残などの指標を一定水準以上に維持させるため、流水式で曝露する必要がある。しかし、その強い変異原性や発ガン性のため、試験者に対する影響が懸念され、流水式による長期曝露試験の実施には大きな困難と危険性が伴う。そこでその代替法としてコレステロールペレット移植試験を実施することとした。この試験法は魚にホルモンを投与する手法として開発された方法で、コレステロールペレット移植法を用いると、一度の移植により魚にホルモンを数週間投与することが可能である (Crim et al., 1988)。ここでは、産卵前のマミチヨグメスに被検物質を含んだコレステロールペレットを移植し、被検物質の卵への移行を評価するとともに、結果として生じる受精卵への毒性影響を検討することとした。また、このコレステロールペレット移植法によって実施した試験結果に基づき、後述するようにNPAHsの慢性毒性値を推定することとした。

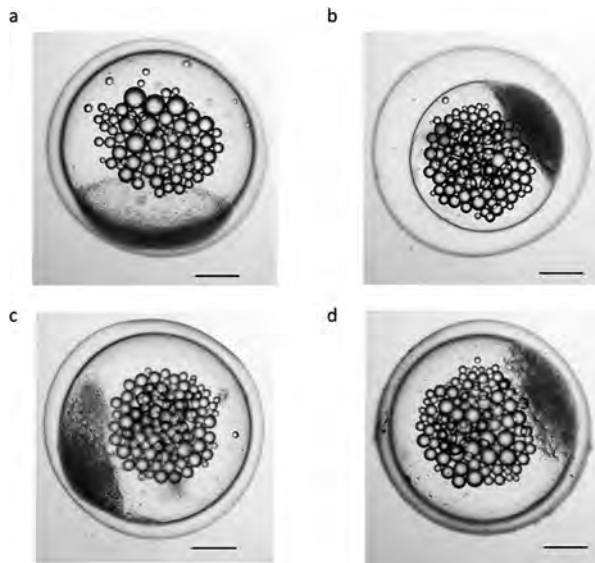
本章では助剤を用いない急性毒性試験で魚に唯一毒性影響が認められた1-ニトロナフタレンおよび、藻類、甲殻類および魚類の急性毒性試験で最も毒性の強かった1-ニトロピレンを被検物質とし、被検物質を含んだコレステロールペレットを産卵前のマミチヨグメスの筋肉中に打ち込み、被検物質の受精卵への移行試験を実施した。また、コレステロールペレットによる被検物質投与後の、受精卵胚正常発生率への影響を検討するとともに、被検物質の移行した受精卵を4週間飼育して成長および生残に及ぼす影響を検討し、被検物質の卵中実測濃度を基にした最低影響濃度 (LOEC) および最大無影響濃度 (NOEC) を明らかにした。さらに、得られた毒性値 (体内濃度) を、報告されている生物濃縮係数で除して求めた水中濃度を慢性毒性値とし、報告されている環境水中濃度と比較することにより、対象物質のリスク評価を行った。

### 3.1 試料と方法

#### 3.1.1 化学物質、試験原液およびコレステロールペレット

1-ニトロナフタレン、1-ニトロピレン、コレステロール、およびココアバターはそれぞれSigma-Aldrich (St. Louis, 米国)、東京化成工業 (東京)、和光純薬工業 (大阪)、大東カカオ (東京) から購入した。その他の試薬は環境分析用試薬を和光純薬工業 (大阪) から購入した。

コレステロールペレットを調製するため、40度以上



**Fig. 1.** Typical examples of normal (a) and abnormal (b: wide perivitelline space; c: embryonic disc is not round; d: cells are heterogeneous in the embryonic disc) blastula-stage embryos of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. Bars, 0.2mm

に暖めて液化したココアバターに1-ニトロナフタレンまたは1-ニトロピレンを溶解した。1-ニトロナフタレンおよび1-ニトロピレンはそれぞれ100および5 g/Lを超えてココアバターに溶かすのは困難であったため、これらの濃度の溶液を高移植区用、これらの濃度の10分の1の濃度の溶液を低移植区用とした。すなわち、10または100 g/Lの1-ニトロナフタレンココアバター溶液、および0.5または5 g/Lの1-ニトロピレンココアバター溶液を調製した。1グラムのコレステロールと200 mgの上記溶液または液化ココアバターのみ（対照区用）をそれぞれ混ぜ合わせた。得られた混合物をそれぞれ平均重量1.8 mgのペレットとして成形した。高移植区および低移植区それぞれのペレット1個あたりの初期含有量は1-ニトロナフタレンが平均30または300  $\mu\text{g}$ 、または1-ニトロピレンが平均1.5または15  $\mu\text{g}$ であった。これらのペレットは後述のNPAHs移行試験および再生産試験に用いた。

### 3.1.2 試験生物

瀬戸内海区水産研究所で継代飼育しているマミチヨグを用いた。継代飼育条件は前述の急性毒性試験と同様であった。試験には2歳までの成魚を用い、NPAHs移行試験では、体重 $17 \pm 0.30$  g（平均 $\pm$ 標準誤差）および再生産毒性試験では、体重 $22 \pm 0.89$  gの成魚をそれぞれ用いた。

### 3.1.3 受精卵へのNPAHs移行試験

60 Lガラス水槽に40 Lの水位になるよう活性炭ろ過海水による流水式試験を実施し、1日あたり20回以上海水が交換するよう流量を設定した。14日間の試験期間中の水質条件は温度： $20 \pm 0.59^\circ\text{C}$ 、溶存酸素： $7.1 \pm 0.20$  mg/L、飽和酸素度： $>90\%$ 、pH： $7.7 \pm 0.08$ であった。マミチヨグメスの背中側にPIT（passive integrated transponder）タグ用のインジェクター（MK-7, Biomark, Boise, 米国）を用いてコレステロールペレット各1個を移植した。それぞれのペレット1個あたりの初期含有量は1-ニトロナフタレンが平均300  $\mu\text{g}$ 、または1-ニトロピレンが平均15  $\mu\text{g}$ であった。NPAHsを加えなかったペレットは対照として用いた。それぞれの実験区に20尾ずつ収容し、毎日1回配合飼料（おとひめC2、丸紅日清飼料、東京）を給餌した。曝露区では、試験開始1、2、4、7、10、および14日目に、対照区では0、1、4、7、および14日目にそれぞれ3尾ずつ採取した。ペレット移植部とその周辺の筋肉を取り除いた後、卵巣とその他の魚体に分け、それぞれホモジナイズした後、NPAHs分析まで $-20^\circ\text{C}$ で冷凍保存した。

### 3.1.4 NPAHsを移植したマミチヨグメスを用いた再生産毒性試験

60 Lガラス水槽に40 Lの水位になるよう活性炭ろ過海水による流水式試験を実施し、1日あたり20回以上海水が交換するよう流量を設定した。メスの腹部を押して産卵しているかどうか確認し、産卵しているマミチヨグメス個体に下記のコレステロールペレットを1回のみ移植し、メス10尾とオス5尾をそれぞれペアリングした。4週の試験期間中は毎日1回配合飼料（おとひめC2）を給餌した。

予備的にマミチヨグメスにコレステロールペレットを移植して飼育した結果、一度に打ち込めるペレットの数は4個が限界であった。また、被検物質の卵中濃度は10倍程度変動するため、投与量を10倍以上変化させないと、低移植区の卵中濃度が高移植区を超えてしまう可能性が想定された。そのため、1-ニトロナフタレン移植試験では、排卵するメス1尾にそれぞれ300  $\mu\text{g}$ 含有したペレットを4個ずつ（高移植区）、30  $\mu\text{g}$ 含有したペレットを2個ずつ（低移植区）、またはNPAHsを加えていないペレットを4個ずつ（対照区）移植した。すなわち、移植した1-ニトロナフタレンの総量は高移植区で1尾あたり1200  $\mu\text{g}$ 、低移植区で



1尾あたり60 µgであった。1-ニトロピレン移植試験では、排卵するメス1尾にそれぞれ15 µg含有したペレットを4個ずつ（高移植区）、1.5 µg含有したペレットを2個ずつ（低移植区）、またはNPAHsを加えていないペレットを4個ずつ（対照区）移植した。すなわち、移植した1-ニトロピレンの総量は高移植区で1尾あたり60 µg、低移植区で1尾あたり3 µgであった。コレステロールペレットの移植にはPITタグ用のインジェクター（MK-7, Biomark）を用いた。

各水槽でペアリング1日後に産卵された卵を除き、ペレット打ち込み後1, 2, 3, および4週の卵を集めた。一部の卵（約5g）はホモジナイズした後、NPAHs分析まで-20℃で冷凍保存した。胚からふ化仔魚における成長への影響を調べるため、実体顕微鏡下で胞胚期後期から原腸胚期前期の胚を観察および選別した。胚の発生がどの段階にあるかは、Armstrong and Child (1965) が報告した基準に沿って決定した。「正常」卵は正常に成長が進んでいる胚として定義し、囲卵腔や胚盤の像から正常かどうか判断した。典型的な正常および異常な胚をFig. 1に示した。胚正常発生率は（正常な卵の数）/（観察した卵の数）×100で算出した。コレステロールペレット移植1週後のNPAHsの卵中濃度はその後の濃度より比較的高く、NPAHsによる影響を強く受けることが考えられたため、1-ニトロナフタレンおよび1-ニトロピレン移植試験1週目に得られた卵のうち、正常と見られた胚はピペットを用いて注意深く集めた。これらは4つのサブグループにランダムに分け（1-ニトロナフタレン高移植区の場合を除く）、それぞれのサブグループはナイロンネット（160×230 mm；編み目サイズ 100 µm）とフロートで作製し、60 L水槽の海水表面およそ80 mmに調整したチャンバー内に収容し、その後の発生を観察した。

1-ニトロナフタレン高移植区の場合は5個の胚のみ使用可能であったため、サブグループに分けなかった。この試験に使用した胚の数はTable 9に示した。ふ化後、ふ化仔魚にアルテミアの幼生（ミヤコ化学、東京）を2日に1回飽食量給餌した。ふ化および斃死は毎日モニターし、試験終了時に魚体重および体長を測定した。4週間の試験期間の水質条件は温度；23±0.12℃、溶存酸素；6.8±0.24 mg/L、飽和酸素度；>90%、pH；7.8±0.018であった。

### 3.1.5 被検物質分析

魚体中NPAHs濃度の測定は前述のNCIを用いた測定法（Albinet et al., 2006；Kawanaka et al., 2007）

を魚体用に改変して測定した。湿重量1 gの魚体、卵巣、および卵のサンプルにサロゲート溶液50 µLを加えた。それぞれのサンプルをアセトン10 mLおよびアセトンヘキサン混合液（1：1, v/v）10 mLを加えて超音波抽出し、400×gで5分間遠心分離し、抽出液を分離した。この抽出液に蒸留水20 mLを加えて水洗した後、400×gで5分間遠心分離し、水層を分離した。この水層をヘキサン5 mLで再抽出して400×gで5分間遠心分離し、水層を分離して抽出液を得た。この抽出液を硫酸ナトリウムで脱水、濃縮した後、10 kPa、60℃で1時間活性化し、ヘキサン10 mLで洗浄したシリカカラム（Supelclean LC-Si, Sigma-Aldrich, St. Louis, 米国）に添加した。このカラムをヘキサン18.5 mLで洗浄後、2%（v/v）ジエチルエーテルヘキサン10 mLでNPAHsを溶出した。抽出液に内部標準溶液50 µLを添加した後、抽出液を0.1または1.0 mLに濃縮した。GC-MSを用いた測定は急性毒性試験と同様の方法で実施した。1-ニトロナフタレンおよび1-ニトロピレンの定量下限値はそれぞれ0.05および0.02 ng/g wet wt.であった。サロゲート溶液として、1-ニトロナフタレン-*d*<sub>7</sub>および1-ニトロピレン-*d*<sub>9</sub>の1 mg/Lアセトン溶液を、内部標準物質溶液として、3-ニトロフルオランテン-*d*<sub>9</sub>の1 mg/Lヘキサン溶液をそれぞれ用いた。1-ニトロナフタレン-*d*<sub>7</sub>および1-ニトロピレン-*d*<sub>9</sub>のサロゲート回収率はそれぞれ83±3.7および72±3.3%であった。

### 3.1.6 統計解析

再生産毒性試験における移植区の受精卵の胚正常発生率、胚のふ化率およびふ化日数、ふ化仔魚の生残率および成長と対照区のそれらとの有意差検定には、データの分散が等分散でないため、Steel'sの多重比較（*p*<0.05）を用いた。NOECは各指標が対照区の値と統計的に有意差を示さない最も高い濃度、LOECは各指標が対照区の値と統計的に有意差を示す最も低い濃度とした。多重比較の統計解析にはMicrosoft Excelのアドインソフト、エクセル統計（社会情報サービス、東京）を用いた。

## 3.2 結果

### 3.2.1 NPAHs移行試験

1-ニトロナフタレンコレステロールペレット移植区（以降、1-ニトロナフタレン移植区）における、1-ニトロナフタレン300 µgを含むコレステロールペ

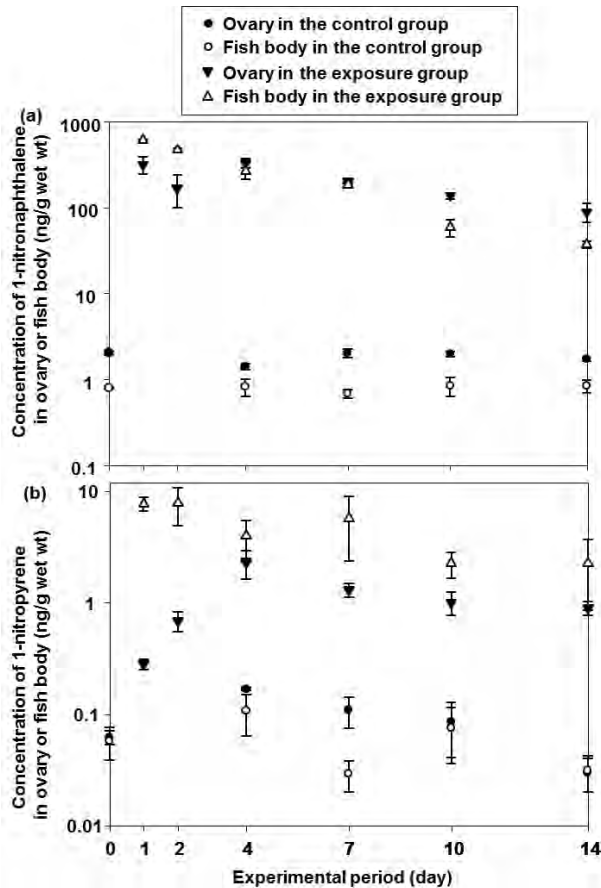


Fig. 2. Concentrations of 1-nitronaphthalene (a) and 1-nitropyrene (b) in the ovary and the rest of the body in the mummichog, *Fundulus heteroclitus*, after cholesterol pellet implantation. Averages and standard errors are presented ( $n = 3$ ). Absence of error bars means that the error bars are smaller than the symbol.

レット移植後の卵巣および魚体中の1-ニトロナフタレン濃度は1日目に卵巣中濃度 $319 \pm 72.4$  ng/g wet wt.および魚体中濃度 $606 \pm 20.3$  ng/g wet wt.と最も高くなり、移植14日後には卵巣中濃度 $89.5 \pm 21.8$  ng/g wet wt.および魚体中濃度 $37.1 \pm 3.37$  ng/g wet wt.まで減少した (Fig. 2 a)。対照区では、全期間を通じて卵巣および魚体中1-ニトロナフタレン濃度は $1.8 \pm 0.083$  ng/g wet wt.および $0.79 \pm 0.058$  ng/g wet wt.で大きく変動せず、その濃度比は $2.51 \pm 0.24$ であった。1-ニトロナフタレン移植区の濃度比は、1, 2, 4, 7, 10, および14日目にそれぞれ $0.53 \pm 0.12$ ,  $0.36 \pm 0.14$ ,  $1.31 \pm 0.18$ ,  $1.11 \pm 0.10$ ,  $2.80 \pm 1.01$ , および $2.37 \pm 0.45$ で経日的上昇が認められ、移植後10日後移植区の濃度比が対照区のそれと同等となった。

1-ニトロピレンコレステロールペレット移植区 (以降、1-ニトロピレン移植区) における、1-ニト

ロピレン $15 \mu\text{g}$ を含んだコレステロールペレット移植後の卵巣中1-ニトロピレン濃度は移植1日目 $0.28 \pm 0.029$  ng/g wet wt.から4日目 $2.28 \pm 0.64$  ng/g wet wt.まで上昇して最も高くなり、移植14日後には $0.89 \pm 0.13$  ng/g wet wt.まで減少した (Fig. 2 b)。1-ニトロピレン移植区における、魚体中1-ニトロピレン濃度は移植1日目 $7.71 \pm 1.07$  ng/g wet wt.から2日目 $7.76 \pm 2.90$  ng/g wet wt.まで上昇して最も高くなり、移植14日後には $2.26 \pm 1.40$  ng/g wet wt.まで減少した (Fig. 2 b)。対照区では、全期間を通じて卵巣および魚体中1-ニトロピレン濃度は $0.12 \pm 0.029$  ng/g wet wt.および $0.11 \pm 0.021$  ng/g wet wt.で大きく変動せず、その濃度比は $0.98 \pm 0.088$ であった。1-ニトロピレンコレステロールペレット移植区の濃度比は、1, 2, 4, 7, 10, および14日目にそれぞれ $0.039 \pm 0.0092$ ,  $0.11 \pm 0.032$ ,  $0.64 \pm 0.19$ ,  $0.62 \pm 0.40$ ,  $0.52 \pm 0.20$ , および $0.90 \pm 0.45$ で経日的上昇が認められ、移植後14日後には移植区の濃度比が対照区のそれと同等となった。

### 3.2.2 再生産毒性試験

1-ニトロナフタレン低移植区においては、移植後1および2週目の1-ニトロナフタレンの卵中濃度 (447および666 ng/g wet wt.) が3および4週目 (158および102 ng/g wet wt.) よりも高かった (Table 7)。対照区の胚正常発生率が $15.0 \pm 6.7\%$ と低く、1-ニトロナフタレンの正常率に及ぼす影響を十分に検討できなかった (Table 8)。ペレット移植により1-ニトロナフタレンが移行したマミチヨグ胚の試験では、低移植区のふ化率 ( $33 \pm 2.7\%$ ) が対照区 ( $67 \pm 4.7\%$ ) に比べて有意に低かった。ふ化日数、ふ化後4週目の生残、体重および体長は低移植区と対照区の間には有意な差は認められなかった (Table 9)。

1-ニトロナフタレン高移植区においては、移植後1週目の1-ニトロナフタレンの卵中濃度 (273,000 ng/g wet wt.) が2, 3および4週目 (567, 343, および202 ng/g wet wt.) よりも高かった (Table 7)。高移植区の胚正常発生率 ( $4.2 \pm 3.2\%$ ) は、移植後1週目に対照区 ( $67 \pm 4.7\%$ ) と比べて低くなり、移植後1週目に得られた正常胚は観察した510個中わずか5個であった (Table 8)。ペレット移植により1-ニトロナフタレンが移行したマミチヨグ胚の試験では、高移植区のふ化率 (40%) が対照区 ( $67 \pm 4.7\%$ ) に比べて低かった。しかし、高移植区の卵数が5個であり、ふ化率などで十分なデータが得られなかったため、統計解析は行わなかった。1-ニトロナフタレンの移植試験において最も感受性の高かった指標はふ化

率であり、この指標をもとに卵中実測濃度 (447 ng/g wet wt) からLOECを算出すると447 ng/g wet wtであった。

1-ニトロピレン低移植区においては、移植後1および2週目の1-ニトロピレンの卵中濃度 (344および281 ng/g wet wt.) が3および4週目 (98.1および199 ng/g wet wt.) よりも高かった (Table 7)。低移植区の胚正常発生率 (22.1±4.2%) は1-ニトロピレンコレステロールペレット移植後2から4週目まで対照区 (41.4±9.5%) と比べて低くなったものの、有意な

差は認められなかった (Table 8)。ペレット移植により1-ニトロピレンが移行したマミチヨグ胚の試験では、低移植区ふ化率 (52±11%) は対照区 (77±4.4%) と比較して減少したものの、有意な差は認められなかった (Table 9)。また、ふ化日数、生残、成長の指標である体重および体長は低移植区と対照区間に有意な差は認められなかった (Table 9)。骨格異常個体は低移植区で2個体認められた。

1-ニトロピレン高移植区においては、移植後1および3週目の1-ニトロピレンの卵中濃度 (958および

**Table 7.** Total amounts of implanted 1-nitronaphthalene or 1-nitropyrene; concentrations and total amounts of test chemicals in eggs; 1 to 4 weeks after maternal implantation of cholesterol pellets containing the test chemicals

	Total amount of test chemical implanted in each aquarium (μg)	Conc. of test chemical in eggs (ng/g wet wt.)			
		1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
<b>1-nitronaphthalene test</b>					
Control group <sup>a</sup>	-	103	39.6	7.3	8.2
Low-exposure group <sup>b</sup>	600	447	666	158	102
High-exposure group <sup>c</sup>	12,000	273,000	567	343	202
<b>1-nitropyrene test</b>					
Control group <sup>a</sup>	-	0.03	0.04	0.03	0.02
Low-exposure group <sup>d</sup>	30	344	281	98.1	199
High-exposure group <sup>e</sup>	600	958	62.4	1,810	34.0

<sup>a</sup> Eggs obtained from 10 ovulated fish, each implanted with a pellet without addition of the nitro-PAHs.

<sup>b</sup> Eggs obtained from 10 ovulated fish, each implanted with a pellet containing 60 μg 1-nitronaphthalene.

<sup>c</sup> Eggs obtained from 10 ovulated fish, each implanted with a pellet containing 1200 μg 1-nitronaphthalene.

<sup>d</sup> Eggs obtained from 10 ovulated fish, each implanted with a pellet containing 3 μg of 1-nitropyrene.

<sup>e</sup> Eggs obtained from 10 ovulated fish, each implanted with a pellet containing 60 μg 1-nitropyrene

**Table 8.** Effects of 1-nitronaphthalene or 1-nitropyrene on the normality of embryos and numbers of normal embryos obtained from ovulated mummichog, *Fundulus heteroclitus*, implanted with a cholesterol pellet with the test chemicals. Numbers of eggs observed are given in parentheses.

	Numbers of normal embryos				Normality (%)				
	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	Average <sup>a</sup>
<b>1-nitronaphthalene test</b>									
Control group <sup>b</sup>	188(558)	25(160)	8(155)	6(107)	33.7	15.6	5.2	5.6	15.0±6.7
Low-exposure group <sup>c</sup>	96(1338)	10(204)	2(124)	6(202)	7.2	4.9	1.6	3.0	4.2±1.2
High-exposure group <sup>d</sup>	5(510)	42(296)	1(135)	5(164)	1.0	14.2	0.7	3.0	4.2±3.2
<b>1-nitropyrene test</b>									
Control group <sup>b</sup>	- <sup>g</sup>	47(122)	46(173)	101(171)	- <sup>g</sup>	38.5	26.7	59.1	41.4±9.5
Low-exposure group <sup>e</sup>	- <sup>g</sup>	14(60)	21(143)	50(173)	- <sup>g</sup>	23.3	14.7	28.9	22.1±4.2
High-exposure group <sup>f</sup>	- <sup>g</sup>	27(137)	29(127)	37(211)	- <sup>g</sup>	19.9	22.8	17.5	20.0±1.4 <sup>h</sup>

<sup>a</sup> Data are expressed as means ± standard error.

<sup>b</sup> Eggs obtained from 10 ovulated fish, each implanted with a pellet with no added chemicals.

<sup>c</sup> Eggs obtained from 10 ovulated fish, each implanted with a pellet with 60 μg 1-nitronaphthalene.

<sup>d</sup> Eggs obtained from 10 ovulated fish, each implanted with a pellet with 1200 μg 1-nitronaphthalene.

<sup>e</sup> Eggs obtained from 10 ovulated fish, each implanted with a pellet with 3 μg 1-nitropyrene.

<sup>f</sup> Eggs obtained from 10 ovulated fish, each implanted with a pellet with 60 μg 1-nitropyrene.

<sup>g</sup> The number of eggs was not counted.

<sup>h</sup> Significantly different from the control value ( $P < 0.05$ ).

1,810 ng/g wet wt.) が2および4週目 (62.4および34.0 ng/g wet wt.) よりも高かった (Table 7)。1-ニトロピレン移植後2から4週間、産卵した卵の胚正常発生率をモニターした結果、移植した1-ニトロピレンの濃度依存的に胚正常発生率が減少し、高移植区の胚正常発生率 (20.0±1.4%) は対照区 (41.4±9.5%) よりも有意に低かった (Table 8)。ペレット移植により1-ニトロピレンが移行したマミチヨグ胚の試験では、ふ化率の減少が認められ、高移植区のふ化率 (52±3.7%) が対照区 (77±4.4%) に比べて有意に低かった。しかし、ふ化日数、生残、成長の指標である体重および体長は高移植区と対照区の間には有意な差は認められなかった (Table 9)。1-ニトロピレンの影響試験において最も感受性の高かったふ化率を指標にし、卵中実測濃度からLOECおよびNOECを算出するとそれぞれ卵中濃度で958および344 ng/g wet wt.であった。

### 3.3 考 察

本研究ではNPAHs含有コレステロールペレット移植後の魚体および卵巣へのNPAHsの移行を明らかにした。移植区卵中1-ニトロナフタレンあるいは1-ニトロピレン濃度は、対照区よりも全ての試験期間において高かった (Table 7)。そのため、今回検討したコレステロールペレット移植法は抱卵魚中の卵にNPAHsを移行させる方法として有効であった。

NPAHs含有コレステロールペレットの移植試験において、移植1週後のNPAHs卵中濃度が最高値であった (Table 7)。そのため、コレステロールペレット移植1週後の胚をその後の試験に用いた。

ナノインジェクション法は魚卵巣中における化学物質の影響を評価する有効な方法として提案されている (Walker et al., 1996) が、この方法は魚体から卵への化学物質の移行を考慮していない。また、魚類多世代試験では、魚卵巣中における化学物質の影響を含めて化学物質の影響を評価できるが、数ヶ月以上化学物質を曝露し続けることが必要である。本研究で検討したコレステロールペレット移植法では、被検物質の物性により移行期間が異なると考えられるが、移植後1週間程度で被検物質が移行した卵を得ることができ、その後の試験期間はOECDの初期生活段階毒性試験 (OECD, 2013) に準じると最長でふ化後60日が試験期間であるため、3ヶ月程度の試験期間で一連の試験を行うことができる。また、被検物質が移行した受精卵を用いた試験については被検物質の曝露の必要がないため、普通に流水式で飼育すればよく、曝露試験の手間が大幅に軽減される。そのため、本手法を用いることにより、NPAHsだけでなくその他の化学物質についても、メス卵巣に移植した化学物質の胚に及ぼす影響を、より簡便な化学物質移植法で見ることが可能になると考えられる。

本研究では両対照区において、卵中からNPAHsが検出された (Table 7)。1-ニトロナフタレンおよび

**Table 9.** Effects of 1-nitronaphthalene or 1-nitropyrene on hatchability, days to hatch, survival, and growth of embryos obtained from ovulated mummichog, *Fundulus heteroclitus*, implanted with a cholesterol pellet with the test chemicals<sup>a</sup>

	Total no. of embryos used	Conc. of test chemical in embryos (µg/g wet wt.)	Hatchability (%)	Days to hatch	Survival at 4 weeks (%)	Growth at 4 weeks	
						Body weight (mg)	Total length (mm)
1-nitronaphthalene test							
Control group <sup>b</sup>	60	0.103	67±4.7	11.3±0.325	89±5.2	30.1±0.619	14.8±0.239
Low-dose group <sup>c</sup>	60	0.447	33±2.7 <sup>g</sup>	12.2±0.668	83±12	40.7±4.90	14.7±0.656
High-dose group <sup>d</sup>	5	273	40 <sup>h</sup>	10.5 <sup>h</sup>	100 <sup>h</sup>	59.3±11.3 <sup>h</sup>	17.5±1.01 <sup>h</sup>
1-nitropyrene test							
Control group <sup>b</sup>	52	0.00005	77±4.4	11.8±0.287	88±5.7	39.6±2.44	13.9±0.257
Low-dose group <sup>e</sup>	52	0.344	52±11	11.9±0.234	93±4.8	41.2±3.64	14.6±0.279
High-dose group <sup>f</sup>	52	0.958	52±3.7 <sup>g</sup>	11.4±0.142	97±3.1	42.6±4.04	14.3±0.448

<sup>a</sup> Data are expressed as means ± standard error.

<sup>b</sup> Eggs obtained from 10 ovulated fish, each implanted with a pellet with no added chemicals.

<sup>c</sup> Eggs obtained from 10 ovulated fish, each implanted with a pellet with 60 µg 1-nitronaphthalene.

<sup>d</sup> Eggs obtained from 10 ovulated fish, each implanted with a pellet with 1200 µg 1-nitronaphthalene.

<sup>e</sup> Eggs obtained from 10 ovulated fish, each implanted with a pellet with 3 µg 1-nitropyrene.

<sup>f</sup> Eggs obtained from 10 ovulated fish, each implanted with a pellet with 60 µg 1-nitropyrene.

<sup>g</sup> Significantly different from the control value ( $P<0.05$ ).

<sup>h</sup> Data insufficient for use in the statistical analysis.

1-ニトロピレンの大阪湾二枚貝中濃度はそれぞれ438-5,222および<2.5-305 pg/g dryと報告されており (Uno et al., 2011), 本研究の対照区における濃度と同程度であった。そのため低濃度ではあるが, 配合飼料あるいは飼育水中に含まれるNPAHsの生物濃縮が影響している可能性が推測される。

ペレット移植1週後の1-ニトロナフタレン高移植区では, 観察した510個の受精卵の中で正常胚はわずか5個しか得られず, 高移植区における胚正常発生率は移植1週後の対照区よりも低かった (Table 8) ため, 魚卵巢中の高濃度1-ニトロナフタレンは卵の成熟に影響を及ぼすことが示唆された。4週間の再生産毒性試験では, 胚正常発生率が1-ニトロピレン高移植区において有意に減少したが, 1-ニトロナフタレン高移植区では有意に減少しなかった (Table 8)。ペレット移植4週間の平均卵中濃度をモル濃度に換算して比較すると1-ニトロナフタレン低移植区および高移植区ではそれぞれ1.98および396 nmol/g wet wt., 1-ニトロピレン低移植区および高移植区ではそれぞれ0.932および2.90 nmol/g wet wt.であった。1-ニトロナフタレン高移植区の平均卵中濃度が, 対照区と比べて有意差が認められた1-ニトロピレン高移植区の平均卵中濃度より高いにもかかわらず, 1-ニトロナフタレン暴露で強い影響が認められなかったため, 卵発生に対する毒性は1-ニトロピレンの方が強いものと推測される。

1-ニトロナフタレン試験における対照区の胚正常発生率は1-ニトロピレン試験における対照区よりも低かった (Table 8)。この結果は1-ニトロナフタレン試験の試験時期がマミチヨグの適切な再生産の時期から外れていたことを示唆している。日本に移入したマミチヨグの性成熟は, 水温などの諸条件により変化はあるものの, 3月から8月末と報告されている

(Shimizu, 1997)。1-ニトロピレンおよび1-ニトロナフタレン試験はそれぞれ6月および8月に実施し, 両試験の水温などの水質は同じになるようにコントロールしたが, 8月は受精卵を得られたものの, 正常な発達をする受精卵の割合が低かったと推測される。

ふ化率は今回検討した被検物質に共通して最も感受性の高い指標であった (Table 9)。1-ニトロナフタレン高移植区における4週後の成長 (体重および全長) が対照区よりも大きかったが, これはおそらく高濃度区で用いた胚の数が少なく, この区の収容密度が対照区よりも低かったことを反映していると考えられる。1-ニトロピレン高移植区においてペレットから移行した1-ニトロピレンにより, 魚胚正常発生率およびふ化率が有意に低下することを明らかにした (Table 8, 9)。そのため, 化学物質が卵巣を經由し胚へ移行することは, 魚の再生産への毒性影響を調べる際に重要な要素であると考えられる。

Michigan湖で採取した淡水魚Lake trout (*Salvelinus namaycush*) の卵巣中における11種NPAHs (1-ニトロナフタレン, 2-ニトロナフタレン, 2-ニトロビフェニル, 3-ニトロビフェニル, 4-ニトロビフェニル, 5-ニトロアセナフテン, 2-ニトロフルオレン, 9-ニトロアントラセン, 9-ニトロフェナントレン, 1-ニトロピレン, 6-ニトロクリセン) の合計濃度は0.81-130 pg/g wet wt.であり, 魚体中における9種NPAHs (1-ニトロナフタレン, 2-ニトロナフタレン, 2-ニトロビフェニル, 3-ニトロビフェニル, 5-ニトロアセナフテン, 2-ニトロフルオレン, 9-ニトロアントラセン, 9-ニトロフェナントレン, 1-ニトロピレン, 6-ニトロクリセン) の合計濃度0.2-31 pg/g wet wt. (4-ニトロビフェニルおよび9-ニトロフェナントレンは魚体中における検出率が30%未満のため合計値に含まれていない) より有意に高く, 魚体

**Table 10.** Effects of 1-nitronaphthalene or 1-nitropyrene on hatchability, days to hatch, survival, and growth of embryos obtained from ovulated mummichog, *Fundulus heteroclitus*, implanted with a cholesterol pellet with the test chemicals <sup>a</sup>

	Toxicity values based on concentration in eggs (ng/g wet)		Ratio of concentration in ovary to that in fish body <sup>a</sup>	Reported BCF (L/kg)	Toxicity values based on concentration in water (µg/L) <sup>b</sup>		PEC (ng/L)
	4-week LOEC	4-week NOEC			4-week LOEC	4-week NOEC	
1-nitronaphthalene	447	-	2.51	93.3	1.9	-	3.7
1-nitropyrene	958	344	0.98	111 <sup>c</sup>	8.8	3.2	1.0

LOEC, lowest-observed-effect concentration; NOEC, no-observed-effect concentration; BCF, bioconcentration factor; PECs are the highest reported concentrations including estimated concentration in river water and sea water.

<sup>a</sup> The ratio of concentration in the ovary to that in the fish body in the control group in Nitro-PAH transfer tests.

<sup>b</sup> The toxicity values are estimated from toxicity values based on concentration in eggs, dividing by the ratio of concentration in the ovary to that in the fish body and reported bioconcentration factor.

<sup>c</sup> Average reported bioconcentration factor.

中および卵巣中のNPAHsプロファイルは類似していた (Huang, 2014)。上記と同じ試料中の9種PAHs, 5種ステラン, および2種ホパンを測定した結果, 9種PAHsの卵巣中における合計濃度は魚体中よりも有意に低く, 5種ステランの合計濃度および2種ホパンの合計濃度については卵巣中および魚体中濃度は同程度の濃度であった (Huang, 2014)。NPAHs移行試験における対照区の全期間を通じた卵巣および魚体中1-ニトロナフタレンおよび1-ニトロピレンの濃度比は $2.51 \pm 0.24$ および $0.98 \pm 0.05$ であった (Fig. 2 a, b)。これらのことからNPAHsは種類によって卵巣中濃度が魚体中濃度よりも数倍程度高くなると考えられ, 物質の種類により卵巣中濃度と魚体中濃度の比は異なる可能性が考えられた。そのため, 自然環境中の濃度比と近似している可能性のあるNPAHs移行試験対照区の1-ニトロナフタレンおよび1-ニトロピレンの卵巣および魚体中の濃度比と, それぞれの物質の生物濃縮係数 (BCF) を用いて卵中濃度を基にした毒性値から水中濃度を基にした毒性値を推測した。

$\text{Log}K_{ow}$  から推測された1-ニトロナフタレンの生物濃縮係数 (BCF) は93.3 (BCFの対数値: 1.97) と報告されている (Yaffe et al., 2001)。卵中濃度を基にした1-ニトロナフタレンのLOEC ( $0.447 \mu\text{g/g wet wt.}$ ) を, NPAHs移行試験における対照区の卵巣および魚体中1-ニトロナフタレンの平均濃度比2.51 (Fig. 2 a) で除して魚体内濃度を推定し, さらにこの推定値を, 報告された生物濃縮係数 (93.3 L/kg) で除すと水中濃度のLOECが $1.9 \mu\text{g/L}$ と推測できる (Table 10)。1-ニトロナフタレンの最高検出濃度は日本の河川における $3.7 \text{ ng/L}$  (Murahashi et al., 2001) であり, また, 環境動態モデルを用いて推測されたカリフォルニア地域の水中 (Yaffe et al., 2001) およびミシガン湖水中 (Huang and Batterman, 2014) の1-ニトロナフタレン濃度はそれぞれ $1.0$ および $11.7 \text{ ng/L}$ であった。これらの濃度は推測した毒性値より2桁以上低かった (Table 10)。1-ニトロナフタレンのNOECが上記水中LOEC推定値 $1.9 \mu\text{g/L}$ の $1/1000$ であることは考えにくく, むしろ $1.9 \mu\text{g/L}$ に近い値であることが考えられることから, 日本の河川水中1-ニトロナフタレンのリスクは低いものと考えられる。また, ミシガン湖で採取されたLake trout (*Salvelinus namaycush*) の卵巣中1-ニトロナフタレン濃度は $0.03\text{--}2.19 \text{ pg/g wet wt.}$  (Huang, 2014) であり, 卵中濃度を基にした1-ニトロナフタレンのLOEC ( $0.447 \mu\text{g/g wet wt.}$ ) より5桁以上低い濃度であり, この比較からも魚類再生産に及ぼす1-ニトロナフタレンのリスクは低いものと考えられる。

NPAHsの魚類における餌および水からの生物濃縮に関する報告では, 1-ニトロピレンの生物濃縮係数 (BCF) は $71\text{--}151 \text{ L/kg}$ の範囲 (Bacolod et al., 2013a) であり, biomagnification factor (BMF) は $0.008$  (Bacolod et al., 2013b) であった。1-ニトロピレンの卵中濃度を基にしたNOECおよびLOEC (NOEC,  $0.344 \mu\text{g/g wet wt.}$ ; LOEC,  $0.958 \mu\text{g/g wet wt.}$ ) を, NPAHs移行試験における対照区の全期間を通じた卵巣および魚体中1-ニトロピレンの濃度比の平均値 $0.98$  (Fig. 2 b) で除し, さらに上記 (Bacolod et al., 2013a) の生物濃縮係数の平均値 ( $111 \text{ L/kg}$ ) で除すと, 水中濃度を基にしたNOECおよびLOECがそれぞれ $3.2$ および $8.8 \mu\text{g/L}$ と推測できる (Table 10)。この推測したNOECおよびLOECは報告された水中における最高濃度 $1 \text{ ng/L}$  (Ohe and Nukaya, 1996) や環境動態モデルを用いて推測されたカリフォルニア地域の水中 ( $2.9 \text{ ng/L}$ , Yaffe et al., 2001) およびミシガン湖水中の1-ニトロピレン濃度 ( $0.17 \text{ ng/L}$ , Huang and Batterman, 2014) より千倍以上高かった (Table 10)。卵内濃度から水中濃度であるNOECあるいはLOECを推定していることから, 不確実性の高い可能性がある。これを考慮して上記で推定したNOECあるいはLOECを安全係数10あるいは100で除したとしても依然として水中濃度の報告値は, これらの推定値を下回っている。また, ミシガン湖で採取されたLake trout (*Salvelinus namaycush*) の卵巣中1-ニトロピレン濃度は $<0.002\text{--}87.61 \text{ pg/g wet wt.}$  (Huang, 2014) であり, 卵中濃度を基にした1-ニトロピレンのNOECおよびLOEC (NOEC,  $0.344 \mu\text{g/g wet wt.}$ ; LOEC,  $0.958 \mu\text{g/g wet wt.}$ ) より3桁以上低い濃度であった。以上のことから, 現在のところ, 1-ニトロナフタレンおよび1-ニトロピレンの環境中濃度における魚類再生産に及ぼす影響はほとんどないと考えられた。

### 3.4 まとめ

本章においては, NPAHsの沿岸海洋生態系への影響評価に資することを目的として, 1-ニトロナフタレンおよび1-ニトロピレンを被験物質とし, 被験物質を含んだコレステロールベレットを排卵前のマミチョグメスに移植し, 被験物質の受精卵への移行試験を実施した。さらに, コレステロールベレットを介した被験物質移植後における受精卵の胚正常発生率への影響を調べるとともに, 被験物質の移行した正常な受精卵を4週間飼育し, 移行した被験物質の成長および生残に及ぼす影響を検討した。

コレステロールペレット移植によるNPAHsの移行試験の結果、抱卵魚中の卵に化学物質を移行させる手法として、コレステロールペレット移植法の有効性を確認した。また、この手法を用いて魚類再生産に及ぼす影響を検討した結果、ふ化率は今回検討した被検物質に共通して最も感受性の高い指標であり、この指標から卵中実測濃度を基にした毒性値を明らかにした。これらの毒性値をNPAHs移行試験における対照区の卵巣および魚体中濃度の比と、報告されたBCFを用いて、水中濃度を基にした毒性値に変換し、報告された環境水中濃度と比較した結果、環境水中濃度は推測した毒性値より3桁程度低く、不確実性を考慮しても現在の環境中濃度レベルの1-ニトロナフタレンおよび1-ニトロピレンが魚類再生産に及ぼす影響はほとんど無いと考えられた。

環境中に放出された化学物質は環境中の物理的および化学的な作用に曝されており、本研究の被検物質であるNPAHsも環境中において同様の作用を受けている。NPAHsと分子構造の近いピレン等のPAHsは紫外線照射により、海産生物に対する毒性が強まり、これらの光毒性は活性酸素種（ROS）が主な原因と考えられている（Fu et al., 2012）。4-ニトロピレンなど一部のNPAHsは紫外線照射によりROSを発生する（Xia et al., 2013）ため、太陽光はNPAHsの環境影響に大きな影響を及ぼす可能性がある。そのため、NPAHsの海産生物に対する毒性の光照射による変化について次章以降で検討を加える。さらに、光照射による毒性の変化の原因についてROSの影響が想定されていることから、次章以降で光毒性の原因についてROSおよび光分解物の発生の両面から検討を加えることとした。

#### 第4章 海産生物に対する毒性の光照射による変化

環境中に放出された化学物質は環境中の物理的および化学的な作用に曝される。本研究の被検物質であるNPAHsと構造が近いピレンなどのPAHsや環境中のPAHs混合物はUV-Aなどの紫外線照射により、海産生物に対する毒性が強まった（Newsted and Giesy, 1987; Pelletier et al., 1997; Swartz et al., 1997; Huang et al., 1997）。光により励起されたPAHsは活性種、主に活性酸素種（reactive oxygen species, ROS）やPAH由来のフリーラジカル、過酸化脂質などを生成し、これらは様々な細胞組織に損傷を与え、急性毒性や遺伝毒性を誘導する（Fu et al., 2012; Lampi et al., 2005; Arfstena et al., 1996）。PAHsの一種であるベンゾ[a]ピレンの光毒性は一重項酸素

のスカベンジャーであるアジ化ナトリウム（ $\text{NaN}_3$ ）により阻害され（Ibuki and Goto, 2002）、光照射されたPAHsにより誘導された過酸化脂質は、フリーラジカルまたは一重項酸素のスカベンジャーであるジチオスレイトール（dithiothreitol, DTT）や $\text{NaN}_3$ 、スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）により誘導が阻害され、一重項酸素の寿命を延ばす重水（ $\text{D}_2\text{O}$ ）により誘導が強まった（Xia et al., 2006）。

4-ニトロピレンや6-ニトロベンゾ[a]ピレンなど数種のNPAHsに、紫外光（UV）の一部UV-Aを照射すると、ROSやフリーラジカルが光照射時間依存的に生成した（Xia et al., 2013）。光照射によるNPAHs分解過程で産生されたROSなどによって誘導された過酸化脂質は $\text{NaN}_3$ により誘導が阻害され、一重項酸素の寿命を延ばす重水素化メタノールにより誘導が強まった（Xia et al., 2013）、また、光強度依存的に過酸化脂質が生成した（Xia et al., 2013）。これらのことから、NPAHsの水産生物に対する毒性は光照射により強まる可能性が推測される。本研究の被検物質であるNPAHsは主にPM 2.5などの粒子状物質に吸着されており、その一部は大気降下物、主に降雨によって水域環境に流入し、最終的には沿岸海域に流入することが想定され、その過程で光毒性の発揮される可能性がある。しかし、光照射条件下におけるNPAHsの海産生物に対する毒性影響の報告例は見あたらず、NPAHsの沿岸海域における環境影響を評価するには既存の情報では不十分である。

本研究では、第2章において栄養段階の異なる海産生物、藻類スケルトネマ、甲殻類シオダマリミジンコ、および魚類マミチヨグ、マコガレイに対するニトロアレーンの急性毒性影響を検討した。また、第3章においては魚類マミチヨグを用いて、慢性毒性試験の代替法としてコレステロールペレット移植試験を実施し、試験結果に基づいてNPAHsの慢性毒性値を推定した。これらの試験生物の中で、シオダマリミジンコについては多くの重要なバイオマーカー遺伝子のシーケンスや、バイオマーカーの有害化学物質暴露への応答が研究され、シオダマリミジンコが生態毒性機構解明のためのモデル生物としての適性を備えている（Raisuddin et al., 2007）。また、シオダマリミジンコのノープリウス期幼生は光を透過するため、光照射による毒性変化を反映しやすいと考えられることから、今回光照射による毒性変化を見る種として選定した。

本章ではNPAHsの沿岸海洋生態系への影響評価に資することを目的として、まず、10種のNPAHsを被検物質とし、シオダマリミジンコを用いて、明条件および暗条件で24時間の遊泳阻害試験を行い、光条件の

違いにより毒性がどの程度変化するのかを検討した。また、光照射により最も毒性が強まった1-ニトロピレンについて、光照射による分解産物を同定した。光毒性による遊泳阻害の検証を行い、さらに、1-ニトロピレンの分解産物が、光照射時における1-ニトロピレンの毒性変化に寄与しているかを明らかにするため、1-ニトロピレン分解産物およびピレンのシオダマリミジンコに対する毒性影響を検討した。

一方、アスコルビン酸(AA)はフリーラジカルや一重項酸素のスキャベンジャーとして報告されている(Machlin and Bendich, 1987)。光毒性による酸化ストレスでシオダマリミジンコの遊泳阻害が起こることを検証するため、AA添加または無添加の条件下で、光照射による1-ニトロピレンのシオダマリミジンコに対する毒性の変化と、光照射した際発生したROS濃度との関連性を検討した。

#### 4.1 試料と方法

##### 4.1.1 被検物質および試験生物

1-ニトロナフタレン、2-ニトロフルオレン、3-ニトロフルオランテン、3-ニトロフェナントレン、1,3-ジニトロピレン、1,6-ジニトロピレン、および6-ニトロクリセンはSigma-Aldrich (St. Louis, 米国) から、1,5-ジニトロナフタレン、2,7-ジニトロフルオレンおよび1-ニトロピレンは東京化成工業(東京)から、1-ヒドロキシピレン、1-アミノピレン、ピレン、およびAAは和光純薬工業(大阪)から、それぞれ購入した。被検物質の水溶解度が低いため、溶解助剤としてアセトン(残留農薬分析用、和光純薬工業、大阪)を用い、それぞれの被検物質のアセトン溶液(20 mM)を試験原液とした。これらの試験原液をろ過海水で2000倍に希釈し、試験液とした。後述の甲殻類遊泳阻害試験における助剤対照区のアセトン濃度は500  $\mu\text{l/L}$ とした。

試験生物としてシオダマリミジンコを用いた。試験生物の入手先、培養方法、ノープリウス期幼生の収集方法は第一章で前述した方法と同様であった。ノープリウス期幼生は甲殻類遊泳阻害試験に用いた。

##### 4.1.2 光照射条件

光照射試験はグローブチャンバー(MLR-350, 三洋電機, 大阪)を用い、照明として太陽光の波長を再現した蛍光灯(波長290-700nm, TRUE-LITE, 32W 3825EX-SS, Light sources, Orange, 米国)を用いた。

後述の甲殻類遊泳阻害試験ではこの蛍光灯を3本用い、可視光(波長400-700 nm)、UV(波長280-400 nm)、およびUV-B(波長280-320 nm)の光強度はそれぞれ12, 0.019および $<0.001 \text{ W/m}^2$ であった。光分解産物を同定するため、後述の光分解試験ではより強い光を照射した。上記の蛍光灯を15本用い、可視光(波長400-700 nm)、UV(波長280-400 nm)、およびUV-B(波長280-320 nm)の光強度はそれぞれ41, 0.072および $<0.001 \text{ W/m}^2$ であった。この可視光の光強度は照度(lux)の値を報告された日中の太陽光における定数(Thimijan, and Heins, 1983), 4.57 ( $\mu\text{mol/s/m}^2$ )/( $\text{W/m}^2$ ) および54 lux/( $\mu\text{mol/s/m}^2$ )で割り、算出した。可視光の照度およびUVの光強度は照度計(LX-1000, カスタム, 東京)および紫外線強度計(Solarmeter models 5.7および6.2, Solartech, Harrison Township, 米国)をそれぞれ用いた。

自然太陽光の年平均日射量は180-480  $\text{W/m}^2$ と報告されている(IPCC, 2001)。ASTM G173-03の参照スペクトルデータ(ASTM, 2003)から、エネルギーに関しては、地球表面上の太陽光の43%が可視光(400-700 nm)、4%がUV( $<400 \text{ nm}$ )と推定される。そのため、可視光およびUVの光強度はそれぞれ77.4-206  $\text{W/m}^2$ および7.20-19.2  $\text{W/m}^2$ と推定できる。水環境中では、水中における光の減衰は水質に関係することが示されている。可視光の垂直拡散減衰定数は0.10-5.73 /mの範囲(Morris et al., 1995)で、UV-Aの10%照射深度は0.3-46 mの範囲(Tedetti and Sempéré, 2006)でそれぞれ変化する。

シオダマリミジンコは潮だまりなど水深の浅い所に生息するため、生息範囲と考えられる水深1mにおける自然太陽光の可視光およびUVの光強度を推測し、光照射試験の光強度と比較した。

光の水中減衰はランベルト・ベールの法則から

$$I_z = I_0 e^{-az} \quad (1)$$

で表せる。ここで $I_z$ は水深 $Z$ mにおける光強度、 $I_0$ は水面直下の光強度、 $Z$ は水深(m)、 $a$ は減衰定数(/m)で表される。(1)式に可視光の垂直拡散減衰定数と推定した可視光の光強度を当てはめて計算すると、水深1mにおける自然太陽光の可視光の光強度は、0.25  $\text{W/m}^2$  ( $77.4 \text{ W/m}^2 \times e^{-5.73/m \times 1\text{m}}$ ) から190  $\text{W/m}^2$  ( $206 \text{ W/m}^2 \times e^{-0.10/m \times 1\text{m}}$ ) と推定できる。

また、(1)式から(2)式が得られ、

$$a = -z \ln(I_z/I_0) \quad (2)$$

この式を用いてUV-Aの10%照射深度から減衰定数を求めると0.00501-7.68 /mとなり、この値を用いて、



可視光と同様に(1)式から水深1mにおける自然太陽光のUV光強度を推定すると $0.0033 \text{ W/m}^2$  ( $7.20 \text{ W/m}^2 \times e^{-7.68/\text{m} \times 1\text{m}}$ ) から $18 \text{ W/m}^2$  ( $19.2 \text{ W/m}^2 \times e^{-0.00501/\text{m} \times 1\text{m}}$ ) であった。そのため、本研究における光照射条件(可視光強度: $12\text{--}41 \text{ W/m}^2$ , UV光強度: $0.019\text{--}0.072 \text{ W/m}^2$ )はシオダマリミジンコの生息環境において推測された光強度範囲に含まれており、生息環境における光条件をほぼ反映していると推測された。

#### 4.1.3 甲殻類急性遊泳阻害試験

10種類のニトロアレーンを被検物質とし、シオダマリミジンコのノープリウス期幼生を用いて、上述の明条件および暗条件下で24時間の遊泳阻害試験を行った。12穴の培養プレート(Thermo Fisher Scientific, Waltham, 米国)に1穴あたり2 mLの試験液と幼生5個体を収容し、 $20^\circ\text{C}$ に設定したグロースチャンバー(MLR-350, 三洋電機, 大阪)内で試験を行った。被検物質の海水中濃度は $0.01$ ,  $0.1$ ,  $1$ , および $10 \mu\text{M}$ に設定し、高濃度から開始して明条件下で遊泳阻害率50%未満になるまで続けた。試験は10回繰り返し実施した。試験終了後、容器内を緩やかにかき混ぜ、付属肢を動かすことができても15秒間遊泳しないものを遊泳阻害個体とした。助剤対照区(アセトン $500 \mu\text{L/L}$ )についても試験を10回繰り返し実施し、明条件および暗条件下における遊泳阻害率はそれぞれ $4.0 \pm 2.7$ および $0.0 \pm 0.0\%$ であった。

光照射によって生成した1-ニトロピレンの光分解物1-ヒドロキシピレン, 1-アミノピレン, および関連物質ピレンの毒性への寄与を明らかにするため次の試験を実施した。1-ヒドロキシピレン, 1-アミノピレン, およびピレンの海水中濃度を $0.01$ ,  $0.1$ ,  $1$ , および $10 \mu\text{M}$ に設定した。助剤対照区(アセトン $500 \mu\text{L/L}$ )についても同様に設定し、試験を8回繰り返した。また、上記の物質以外の光分解物が微量に生成し、光照射による毒性変化に寄与する可能性について確認するため、次の試験を実施した。光条件下で影響が認められた1-ニトロピレン $10 \mu\text{M}$ と助剤対照区(アセトン $500 \mu\text{L/L}$ )を暗条件および明条件下で24時間置いた後、1穴あたりこの試験液2 mLと幼生5個体を収容し、暗条件および明条件下で24時間曝露試験を実施した。試験は6回繰り返し実施した。光条件の組み合わせは明・明, 明・暗, 暗・明, および暗・暗の4通りとした。試験終了後、上記の方法で遊泳阻害個体数を確認した。また、ノープリウス期幼生を用いて、後述のROS発生試験の試験液についても曝露試験を実施し、30または60分おきに遊泳阻害個体数を確

認した。試験は6回繰り返し実施した。

#### 4.1.4 光分解試験

光分解試験は10 mLガラス試験管に $2 \mu\text{M}$  1-ニトロピレンアセトン溶液5 mLを収容し、グロースチャンバー(MLR-350)内で明条件および暗条件下で $20^\circ\text{C}$ , 24時間の試験を実施した。明条件では、太陽光の波長を再現した蛍光灯(TRUE-LITE, 32W 3825EX-SS)を15本用いた。光照射開始時および24時間照射時にこれらの試験液を採取し、GC-MSの分析に供した。キャピラリーカラムHB 5-MS, 30m,  $0.25\text{mmID}$  (Agilent Technologies, Santa Clara, 米国)を装着したGC/MS (Agilent, 6890N, 5975 inert; Yokogawa Analytical Systems, 東京)を用い、電子イオン化法で測定モードをSCANとして測定した。注入口の温度は $280^\circ\text{C}$ とし、検出器の部分に $290^\circ\text{C}$ の温度をかけ、質量分析計のイオン源部分に $240^\circ\text{C}$ の温度を得た。カラム温度は $100^\circ\text{C}$ で2分間保持した後、 $20^\circ\text{C}/\text{分}$ で $200^\circ\text{C}$ まで昇温、引き続き $5^\circ\text{C}/\text{分}$ で $320^\circ\text{C}$ まで昇温後、14分間保持した。ヘリウム流量は $1.0 \text{ mL/min}$ とし、分析時間は45分であった。得られたデータはデータ閲覧ソフト(ChemStation, Agilent Technologies, Santa Clara, 米国)で解析し、検出したピークをNIST 2008 MS library bundle (Agilent Technologies, Santa Clara, 米国)のデータと照合して、同定した。

#### 4.1.5 活性酸素種(ROS)生成試験

ROS生成試験は100 mLのネジ口三角フラスコに100 mLの試験液を収容して実施した。試験液は $0.01$ ,  $0.1$ ,  $1$ , および $10 \mu\text{M}$ の1-ニトロピレンろ過海水溶液を用い、助剤対照区として $500 \mu\text{L/L}$ のアセトンろ過海水溶液を用いた。これらの試験液を暗条件または甲殻類遊泳阻害試験と同じ明条件下で $20^\circ\text{C}$ , 210分間試験した。これらの試験液の一部は甲殻類遊泳阻害試験に供し、30または60分毎に遊泳阻害個体を確認するとともに、これらの試験液中のROSを60分毎に測定した。

明条件下および暗条件下の $10 \mu\text{M}$ ニトロピレン海水溶液の活性酸素種(ヒドロキシラジカル, パルオキシナイトライト, 次亜塩素酸イオン, 一酸化窒素)の経時変化を測定し、同時系列の遊泳阻害率と比較した。また、明条件下の $10 \mu\text{M}$ ニトロピレン海水溶液に抗酸化剤であるアスコルビン酸を添加し、活性酸素種の濃度および遊泳阻害率の抑制効果を調べた。活性酸素種の測定は、積水メディカ

ル（東京）の活性酸素種蛍光プローブ Aminophenyl Fluorescein (APF), Hydroxyphenyl Fluorescein (HPF), Diaminorhodamine-4 M AM (DAR-4 M AM) を使用し、励起/蛍光波長はそれぞれ485/535 nm, 485/535 nm, および544/590 nmで測定した。APFは、ヒドロキシルラジカル、パーオキシナイトライト、次亜塩素酸イオンと反応し、HPFはヒドロキシルラジカルとパーオキシナイトライトと反応し (Setsukinai et al., 2003), DAR-4 M AMは一酸化窒素と反応する基質 (Kojima et al., 2001) である。全ての試験液は、使用した海水と同じpH 8.3に調整し、活性酸素種の蛍光プローブは試験液で1000倍に希釈して使用した。

#### 4.1.6 統計解析

甲殻類遊泳阻害試験における遊泳阻害の処理間の違いの有意差検定には、データの分散が等分散でないた

め、Mann-Whitneyの $U$  test ( $P < 0.05$ ) を用いた。また、ROS生成試験における遊泳阻害および比較蛍光強度の違いの有意差検定には、Tukeyの多重比較 ( $P < 0.05$ ) を用いた。統計解析にはSPSS社（東京）のSPSS 13.0J for Windowsを用いた。

## 4.2 結果

### 4.2.1 光照射によるNPAHsの毒性変化

シオダマリミジンコノープリウス期幼生を用いて毒性の変化を検討した10種類のNPAHsのうち、1,5-ジニトロナフタレンを除く9種類は、暗条件よりも明条件で高い遊泳阻害率を示した (Table 11)。1-ニトロピレンは、全ての濃度区 (0.01-10  $\mu\text{M}$ ) において、明条件下で遊泳が阻害され、暗条件下と比較して有意に明条件下の遊泳阻害率が高かった。3-ニトロフルオランテンは0.1, 1, および10  $\mu\text{M}$ の濃度区にお

**Table 11.** Effects of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons on immobilization of *Tigriopus* in dark or under irradiation with environmental level light (290–700 nm, a visible light and UV intensity; 12 and 0.019  $\text{W m}^{-2}$ , respectively) after 24 hours

Chemical	Condition	Immobilization of each dose (%)			
		0.01 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
1-nitropyrene	Light	28 ± 6.1*	100 ± 0.0*	100 ± 0.0*	100 ± 0.0*
	Dark	2.0 ± 2.0	2.0 ± 2.0	4.0 ± 2.7	4.0 ± 2.7
3-nitrofluoranthene	Light	8.0 ± 3.3	72 ± 6.8*	100 ± 0.0*	100 ± 0.0*
	Dark	6.0 ± 3.1	2.0 ± 2.0	4.0 ± 2.7	26 ± 8.5
2-nitrofluorene	Light	n.d.	0 ± 0.0	34 ± 5.2*	100 ± 0.0*
	Dark	n.d.	6.0 ± 3.1	8.0 ± 4.4	10 ± 4.5
3-nitrophenanthrene	Light	n.d.	4.0 ± 2.7	30 ± 5.4*	98 ± 2.0*
	Dark	n.d.	4.0 ± 2.7	6.0 ± 3.1	78 ± 7.0
1-nitronaphthalene	Light	n.d.	n.d.	2.0 ± 2.0	100 ± 0.0*
	Dark	n.d.	n.d.	4.0 ± 2.7	8.0 ± 4.4
1,3-dinitropyrene	Light	n.d.	n.d.	10 ± 3.3	100 ± 0.0*
	Dark	n.d.	n.d.	11 ± 4.6	0.0 ± 0.0
2,7-dinitrofluorene	Light	n.d.	n.d.	8.0 ± 4.4	32 ± 4.4*
	Dark	n.d.	n.d.	10 ± 4.5	8.0 ± 3.3
6-nitrochrysene	Light	n.d.	n.d.	8.0 ± 4.4	24 ± 5.0*
	Dark	n.d.	n.d.	2.0 ± 2.0	4.0 ± 2.7
1,6-dinitropyrene	Light	n.d.	n.d.	n.d.	16 ± 4.0*
	Dark	n.d.	n.d.	n.d.	2.0 ± 2.0
1,5-dinitronaphthalene	Light	n.d.	n.d.	n.d.	10 ± 4.5
	Dark	n.d.	n.d.	n.d.	6.0 ± 4.3

Values in each test group are expressed as means ± standard error in 10 trials. Asterisk indicate a significant difference between light and dark groups, respectively (\* $P < 0.05$ , Mann-Whitney  $U$ -test). The immobilization of *Tigriopus* as control were 0.0 ± 0.0 and 4.0 ± 2.7 %, respectively in dark or under irradiation with environmental level light with solvent. n.d. means no data.

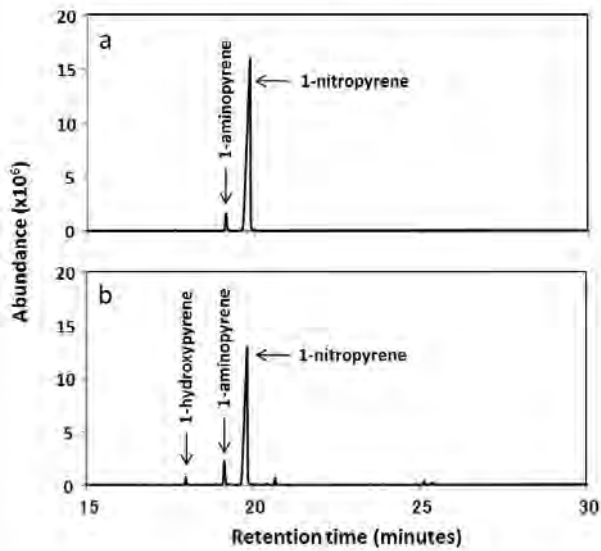


Fig. 3. TICs of the initial solution of 2  $\mu\text{M}$  of 1-nitropyrene in acetone (a) and the solution by irradiation with 290–700 nm light for 24 hours (b) using GC-MS analysis.

いて、2-ニトロフルオレンと3-ニトロフェナントレンは1および10  $\mu\text{M}$ の濃度区において、1-ニトロナフタレン、1,3-ジニトロピレン、1,6-ジニトロピレン、6-ニトロクリセン、および2,7-ジニトロフルオレンは10  $\mu\text{M}$ の濃度区において、明条件で遊泳阻害が認められ、暗条件下と比較して有意に明条件下の遊泳阻害率が高かった (Table 11)。

#### 4.2.2 1-ニトロピレンの光照射による光分解産物の同定

試験開始時および光照射24時間後の2  $\mu\text{M}$  1-ニトロピレンアセトン溶液をGC-MSで分析し、TICを得た (Fig. 3)。光照射溶液のTICから5種類の分解産物が検出され、NISTデータベースと照合したところ、これらのうち2種は1-ヒドロキシピレンおよび1-アミノピレンと同定された (Fig. 3 a)。1-アミノピレンは光照射前の溶液のTICからもピーク強度 $1.6 \times 10^6$ で検出されたものの、光照射後の溶液ではピーク強度 $2.2 \times 10^6$ で検出され、ピーク強度が約1.4倍強くなった (Fig. 3 a, b)。甲殻類毒性試験における光条件下で24時間照射した1-ニトロピレンアセトン溶液および暗条件下における24時間後の同溶液のTICは試験開始前のTICとはほぼ同様であり、甲殻類遊泳阻害試験の光条件下で24時間照射した1-ニトロピレンアセトン溶液からは1-アミノピレン以外の分解産物は検出されなかった。

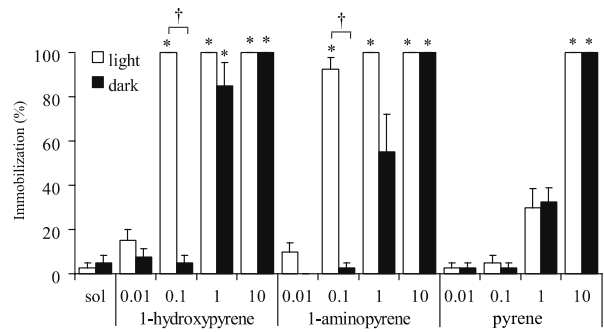


Fig. 4. Effects of pyrene-related substances on the immobilization of *Tigriopus japonicus* after exposure to the dark or artificial environmental light conditions for 24 h. Values are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean of 8 trials. †,  $p < 0.05$ , Mann-Whitney U-test between the light- and dark-exposed groups at the same concentration of chemical substance; \*,  $p < 0.05$ , Tukey post-hoc test versus the solvent-only control (sol) under the same lighting condition.

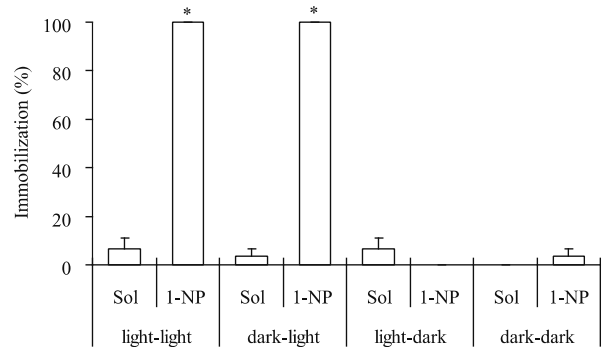
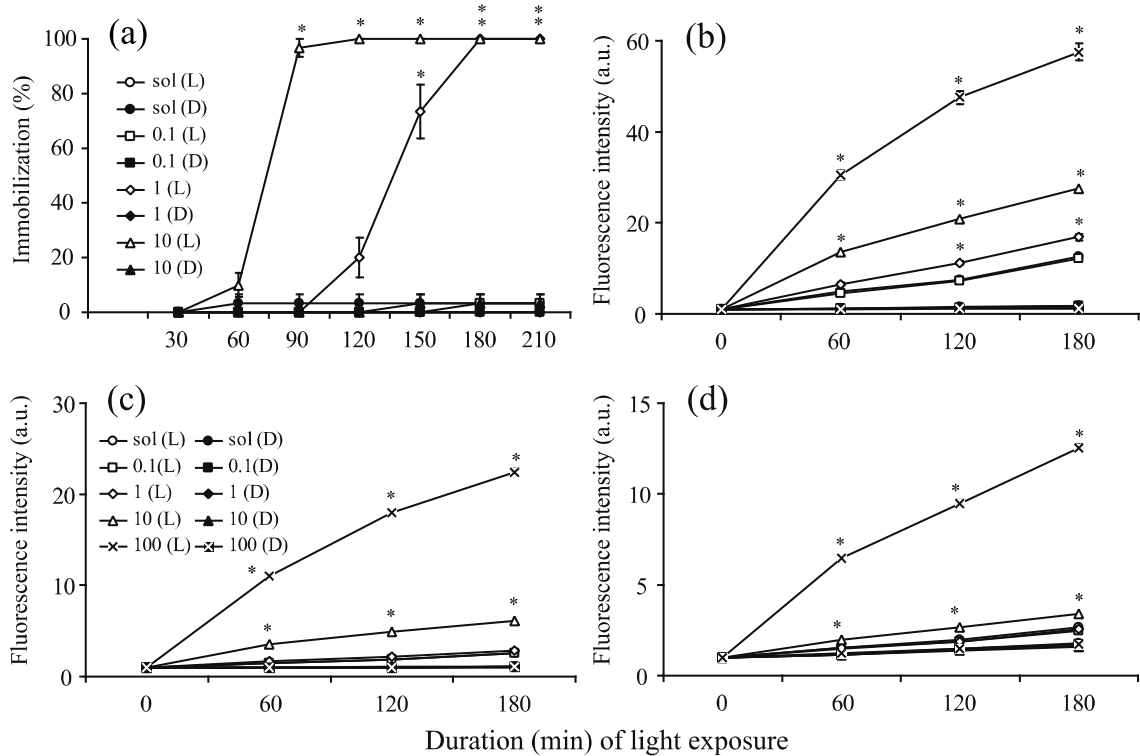


Fig. 5. Effects of nitropyrene on the immobilization of *Tigriopus japonicus* under various combinations of exposure to dark and artificial environmental light conditions. Solutions of 10  $\mu\text{M}$  1-nitropyrene (1-NP) and the solvent-only control (sol) were exposed to either light or dark conditions for 24 h, after which nauplii were exposed to these solutions under light or dark conditions for 24 h. Values are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean of 6 trials. \*,  $p < 0.05$ , Mann-Whitney U-test between light and dark groups.

#### 4.2.3 光照射による1-ニトロピレン関連物質の毒性変化

シオダマリミジンコノープリウス期幼生を用いて毒性の変化を検討した1-ヒドロキシピレンおよび1-アミノピレンは暗条件下よりも明条件下で高い遊泳阻害率を示した (Fig. 4)。1-ヒドロキシピレンおよび



**Fig. 6.** Effects of light on (a) immobilization of *Tigriopus japonicus* and the quantities of various reactive oxygen species (ROS) as indicated by fluorescence intensity of (b) aminophenyl fluorescein (APF; labels hydroxyl radical, peroxyxynitrite, and hypochlorous acid ion), (c) hydroxyphenyl fluorescein (HPF, binds to hydroxyl radical and peroxyxynitrite), and (d) diaminorhodamine-4M acetoxymethyl ester (DAR-4M AM, for measurement of nitric oxide) in the presence of 1-nitropyrene (1-NP). The doses of 1-NP were 0.1, 1, and 10  $\mu\text{M}$  for the immobilization test and 0.1, 1, 10, and 100  $\mu\text{M}$  for the ROS assay. Values are expressed as means  $\pm$  standard error (immobilization,  $n = 6$ ; ROS,  $n = 4$ ). \*,  $p < 0.05$ , Tukey post-hoc test between 1-NP and solvent-only (sol) groups under the same lighting conditions. D, dark; L, light. a.u. means arbitrary unit.

び1-アミノピレンは0.1, 1, および10  $\mu\text{M}$ の濃度区において明条件下で遊泳が阻害され, 暗条件下では1  $\mu\text{M}$ と10  $\mu\text{M}$ の濃度区において遊泳が阻害された (Fig. 4)。0.1  $\mu\text{M}$ の濃度区において, 暗条件下と比較して有意に明条件下の遊泳阻害率が高かった。ピレンでは1および10  $\mu\text{M}$ の濃度区において, 明暗両条件下ともに遊泳が阻害されたものの, 光条件の違いによる遊泳阻害率の有意差は認められなかった (Fig. 4)。

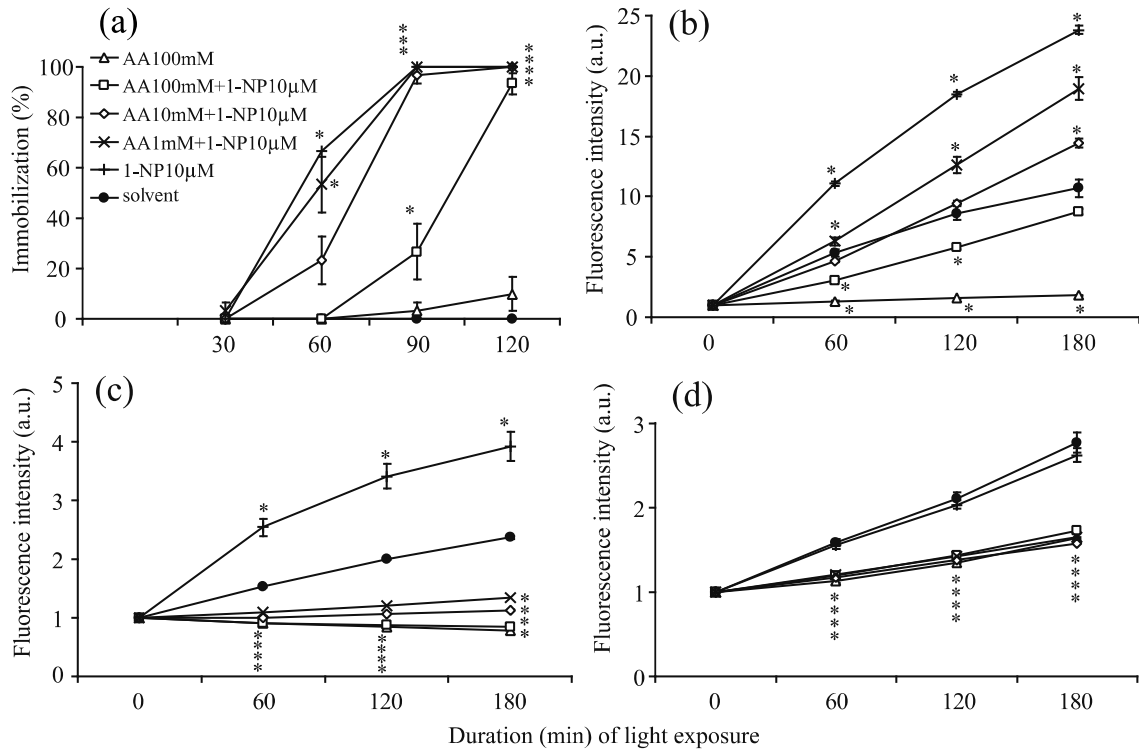
1-ニトロピレン10  $\mu\text{M}$ の濃度区における明暗4つの組み合わせによる試験では, 明明・暗明の試験区でシオダマリミジンコノープリウス期幼生の遊泳が阻害され, 明暗・暗暗の試験区では阻害されなかった (Fig. 5)。

#### 4.2.4 光照射による1-ニトロピレン溶液中におけるROSの生成

明条件下におけるシオダマリミジンコノープリウス

期幼生の遊泳阻害率は, 1-ニトロピレン10  $\mu\text{M}$ 濃度区においては90分以降から, 1  $\mu\text{M}$ 濃度区では150分以降から対照区と比べて有意に高かった (Fig. 6 a)。明条件下におけるAPFによる活性酸素種の検出は, 1-ニトロピレン10および100  $\mu\text{M}$ 濃度区においては60分以降から, 1  $\mu\text{M}$ 濃度区においては120分以降から蛍光強度が対照区よりも有意に高かった (Fig. 6 b)。明条件下におけるHPFとDAR-4M AMによる活性酸素種の検出では, 1-ニトロピレン10および100  $\mu\text{M}$ 濃度区において, 60分以降から蛍光強度が対照区よりも有意に高かった (Fig. 6 c, d)。

AAの添加実験では, 添加したAA濃度が高いほど遊泳阻害率の上昇が遅くなった (Fig. 7 a)。明条件下における1-ニトロピレン10  $\mu\text{M}$ 濃度区でのシオダマリミジンコノープリウス期幼生の遊泳阻害率は, AA無添加区およびAA 1 mM 添加区では60分以降から, AA10および100 mM 添加区では90分以降から対照区と比べて有意に高かった (Fig. 7 a)。また, 各



**Fig. 7.** Effects of ascorbic acid (AA) on (a) immobilization of *Tigriopus japonicus* and the quantities of various reactive oxygen species (ROS) as indicated by fluorescence intensity of (b) aminophenyl fluorescein (APF; labels hydroxyl radical, peroxyxynitrite, and hypochlorous acid ion), (c) hydroxyphenyl fluorescein (HPF, binds to hydroxyl radical and peroxyxynitrite), and (d) daminorhodamine-4M acetoxyethyl ester (DAR-4M AM, for measurement of nitric oxide) in the presence of 1-nitropyrene (1-NP). Values are expressed as means  $\pm$  standard error (immobilization,  $n = 6$ ; ROS,  $n=4$ ). \*,  $p < 0.05$ , Tukey post-hoc test between 1-NP and the solvent-only (Sol) groups under the same lighting conditions. a.u. means arbitrary unit.

種蛍光プローブによる活性酸素種の濃度についても添加したAA濃度が高いほど蛍光強度の上昇が抑えられた (Fig. 7 b, c, d)。

### 4.3 考 察

本研究では、光強度が環境中レベルの光 (波長 290–700 nm, 可視光および紫外光の光強度: それぞれ12および0.019 W/m<sup>2</sup>) 照射によるNPAHsのシオダマリミジンコノープリウス期幼生に対する毒性の変化を明らかにした。検討した10種類のNPAHsのうち1,5-ジニトロナフタレンを除く9種類は、光照射により毒性が強まった (Table 11)。毒性の変化を検討した物質のうち1-ニトロピレンが最も光照射により毒性が強まり、暗条件下と比較して明条件下で毒性が1000倍以上強まった (Table 11)。これらのことから、1-ニトロピレンを始めとするいくつかのNPAHsは、シオダマリミジンコの遊泳を阻害する光毒性を有することが考えられる。

光照射条件下における1-ニトロピレンの分解産物

の生成を検討した結果、光 (波長290–700 nm, 可視光および紫外光の光強度: それぞれ41および0.072 W/m<sup>2</sup>) 照射24時間後の1-ニトロピレンアセトン溶液から1-ヒドロキシピレンの生成が認められた (Fig. 3 b)。1-ヒドロキシピレンの光分解産物として1-ヒドロキシピレンおよびモノヒドロキシ1-ニトロピレン類が報告されている (Yu, 2002)。しかし、甲殻類急性遊泳阻害試験における光強度 (波長290–700 nm, 可視光および紫外光の光強度: それぞれ12および0.019 W/m<sup>2</sup>) で24時間照射した1-ニトロピレンアセトン溶液からはこれらの光分解産物は検出されず、毒性試験における光強度で24時間照射しても、生成する光分解産物は微量であると考えられる。1-アミノピレンは光照射前の初期溶液からもピーク強度1.6 x 10<sup>6</sup>で検出され (Fig. 3 a), 光照射24時間後の溶液ではピーク強度が2.2 x 10<sup>6</sup>となり、初期溶液より若干高まった (Fig. 3 b) ことから、1-アミノピレンは1-ニトロピレンから光だけでなく光照射以外でも生成する分解産物であると考えられる。

光条件下における1-ヒドロキシピレンおよび1-

アミノピレンの毒性は暗条件下よりも1から10倍高まった (Fig. 4) もの、これらの分解産物の光照射による毒性変化は1-ニトロピレンよりも小さかった (Table 11)。光条件の組み合わせによる1-ニトロピレンの毒性影響試験では、曝露試験時に明条件であった試験区のみシオダマリミジンコノープリウス期幼生の遊泳が阻害された (Fig. 5) ことから、曝露前に光照射によって生成した分解産物は、極端に寿命の短い活性種を除き1-ニトロピレンの光照射による毒性変化に寄与しないことを示している。甲殻類毒性試験における光条件下で24時間光照射した1-ニトロピレン溶液から1-アミノピレンを除く分解産物は同定されなかった。以上の結果から、光分解産物は光照射による1-ニトロピレンの毒性変化にはほとんど寄与しないと考えられる。

ROS生成試験では、検討した全ての蛍光基質の相対蛍光度が光照射60分以降対照区と比べて有意に上昇し (Fig. 6 b, c, d), ROSの生成に伴いシオダマリミジンコの遊泳阻害率も有意に上昇した (Fig. 6 a)。AA添加試験では、AAの添加によりROSの生成およびシオダマリミジンコの遊泳阻害率の上昇が抑えられた (Fig. 7)。4-ニトロピレンや6-ニトロベンゾ [a] ピレンなど数種のNPAHsに、紫外光 (UV) の一部UV-Aを照射すると、ROSやフリーラジカルが光強度依存的に生成した (Xia et al., 2013)。ベンゾ [a] ピレンやピレンにUV-Aおよび可視光を照射すると、光強度依存的に細胞毒性が誘導された (Botta et al., 2009)。以上のことから、光照射による1-ニトロピレンの毒性変化には主にROSの生成が寄与していると考えられ、また、ROSの生成から遊泳阻害が起こることを実験的に示した。一重項酸素を含むフリーラジカルは有機分子を含む溶液中で連鎖反応を引き起こし、様々な種類の活性酸素種や活性化分子を生成する (Voeikov, 2001)。ROS生成試験では、全ての蛍光基質の蛍光強度がほぼ同様の挙動を示した (Fig. 6, 4-5) ため、ROSまたはフリーラジカルの連鎖反応を反映している可能性が考えられた。これらの連鎖反応の結果、細胞内の過酸化脂質の増加など、試験生物内の酸化ストレスが上昇し、結果として遊泳阻害に至るメカニズムの存在が考えられる。

UV照射によるピレンの甲殻類に対する毒性誘導が報告されている (Newsted and Giesy, 1987; Pelletier et al., 1997; Swartz et al., 1997) が、本研究では光照射によるピレンのシオダマリミジンコに対する毒性誘導は観察されなかった (Fig. 4)。ピレンのmysid shrimp (*Mysidopsis bahia*) に対する毒性は蛍光灯下 (UV-AおよびUV-Bの光強度：それぞれ

$9.70 \pm 0.66$  および  $3.37 \pm 0.22 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) よりもUV照射下 (UV-AおよびUV-Bの光強度：それぞれ  $397 \pm 35.1$  および  $134 \pm 22.8 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) において約28倍高まった (Pelletier et al., 1997)。本研究における甲殻類毒性試験では、UV-AおよびUV-Bの光強度はそれぞれ  $0.019$  および  $< 0.001 \mu\text{W}/\text{m}^2$  ( $1.9$  および  $< 0.1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) であり、光によるピレンの毒性誘導の違いには照射した光強度の違いが反映されていると推測される。また、NPAHsは上記の光強度の光照射により毒性が高まった (Table 11) ことから、ピレンなどのPAHsよりも光強度が100倍程度弱い光の照射により毒性の誘導が起こる可能性が示唆される。

環境中に放出されたNPAHsは自然太陽光に曝されるため、光照射によりNPAHsの毒性が強まるか否かを見出すことは重要である。光により励起されたPAHは活性種として、主にROSやPAH由来のフリーラジカルを生じ、体内に吸収された後には過酸化脂質などを生成する (Fu et al., 2012; Lampi et al., 2005; Arfstena et al., 1996)。これらは様々な細胞組織に損傷を与え、急性毒性や遺伝毒性を誘導する (Fu et al., 2012; Lampi et al., 2005; Arfstena et al., 1996)。数種のNPAHsに、紫外光 (UV) の一部UV-Aを照射すると、ROSやフリーラジカルが光強度依存的に生成する (Xia et al., 2013)。一重項酸素などのROSはアミノ酸、タンパク質、脂質、およびDNAと反応し、結果として細胞組織に損傷を与え病気を引き起こす (Tyrrell, 2000)。またROSはDNAやタンパク質に損傷を与え、老化、炎症、心血管疾患、悪性腫瘍、およびその他の年齢に関係した病気を引き起こす (Loft and Poulsan, 1996; Stadtman and Berlett, 1997)。多くの海産生物は海洋環境中において低濃度であるものの、光照射で毒性のあるROSを生じるNPAHsに曝露され、かつ同時に自然光にも曝されている。そのため、もしNPAHsの濃度レベルが高く、光照射時間が長くなれば、海産生物に有害な影響が引き起こされる可能性がある。

日本の河川中における1-ニトロナフタレン (MW: 173.17) および1,5-ジニトロナフタレン (MW: 218.17) の最高検出濃度はそれぞれ  $3.7$  および  $10 \text{ ng}/\text{L}$  ( $21$  および  $46 \text{ pM}$ ) と報告されている (Murahashi et al., 2001)。河川中および海水中における1-ニトロピレンの最高検出濃度はそれぞれ淀川において  $1 \text{ ng}/\text{L}$  ( $4 \text{ pM}$ , Ohe and Nukaya, 1996) および日本海において  $0.5 \text{ pg}/\text{L}$  ( $2 \text{ fmol}/\text{L}$ , Murahashi et al., 2001) と報告されている。環境動態モデルを用いて、Yaffe et al. (2001) はカリフォルニア水中 (環境モデルにおける水であり、海水や河川水などに区別されてい

ない)の1-ニトロピレン (MW:247.25), 1-ニトロナフタレン, および2-ニトロフルオレン (MW:211.22)濃度をそれぞれ2.9, 1.0, および2.2 ng/L (12, 5.8, および10 pM)と推定した。また, Huang and Batterman (2014)はミシガン湖水中の1-ニトロピレン, 1-ニトロナフタレン, 2-ニトロフルオレン, および6-ニトロクリセン (MW:273.29)濃度をそれぞれ0.17, 11.7, 8.7, および0.11 ng/L (0.69, 68.41, および0.40 pM)と推定した。光条件下におけるシオダマリミジンコノープリウス期幼生の遊泳阻害は1-ニトロピレン0.01-10  $\mu$ M濃度区, 1-ニトロナフタレン10  $\mu$ M濃度区, 1,5-ジニトロナフタレン10  $\mu$ M濃度区, および2-ニトロフルオレン1-10  $\mu$ M濃度区, および1-ニトロクリセン1-10  $\mu$ M濃度区で認められ (Table 11), これらの影響が認められたNPAHs濃度はこれらのNPAHsの報告された環境水中濃度より千倍以上高かった。以上のことから, 現在のところ, 1-ニトロピレン, 1-ニトロナフタレン, 1,5-ジニトロナフタレン, 2-ニトロフルオレン, および6-ニトロクリセンの環境中濃度における, 光による毒性変化を考慮した海産甲殻類に及ぼす影響は限定的と考えられる。しかし, 光強度依存的に過酸化脂質が生成し (Xia et al., 2013), 光強度が強くなると毒性誘導が増す可能性が考えられる。モクズガニの一種である *Neohelice granulata*を用いた試験では, UV-B照射によりROS, 過酸化脂質, およびROSのスカベンジャーとして作用するカタラーゼの生成が誘導され (Vargas et al., 2011), 光強度の強いUVを照射すると海産甲殻類に対して致死影響が認められる (Naganuma et al., 1997; Wübben., 2000) ことから, 干潟など自然光の光強度が強い環境に生息する生物に対する影響について, より詳細に検討する必要があると考えられる。3-ニトロフルオランテン, 6-ニトロクリセン, 2,7-ジニトロフルオレン, 1,3-ジニトロピレン, 1,6-ジニトロピレン, および1,8-ジニトロピレンの環境水中濃度は報告されておらず, これらの物質の海産生物に及ぼす影響を評価することはできなかった。

#### 4.4 まとめ

本章においては, NPAHsの沿岸海洋生態系への影響評価に資することを目的として, 10種のNPAHsを被検物質とし, 光条件の違いによりシオダマリミジンコに対する毒性が変化するか検討した。その結果, 検討した10種類のNPAHsのうち9種類は, 光照射により毒性が強まり, 1-ニトロピレンを始めとするいく

つかのNPAHsは, シオダマリミジンコの遊泳を阻害する光毒性を有することが考えられる。

光照射によって最も毒性が強まった1-ニトロピレンについて, 光による毒性変化への寄与を光分解産物および光照射により発生するROSの両面から検討した結果, 毒性変化には主にROSの生成が寄与していると考えられ, 生成したROSは有機分子を含む溶液中で連鎖反応を引き起こして細胞内の過酸化脂質の増加など試験生物内の酸化ストレスが上昇し, 結果として遊泳阻害に至るメカニズムの存在が考えられる。

本研究で光条件下においてシオダマリミジンコの遊泳阻害が認められた濃度と報告された環境水中濃度を比較して, 光照射で毒性のあるROSを生じるNPAHsの影響を検討した結果, 影響が認められた濃度は報告された環境水中濃度より千倍以上高く, 光による毒性変化を考慮しても, これらのNPAHsは現在の環境水中濃度で海産甲殻類に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。しかし, 光強度が強くなると毒性誘導が増す可能性が考えられ, また, 光強度の強いUVを照射すると海産甲殻類に対して致死影響が認められることから, 干潟など自然光の光強度が強い環境に生息する生物に対するNPAHsの影響について, より詳細に検討する必要があると考えられる。

## 第5章 総合考察

ニトロアレーン (NPAHs)は水域環境を含む全ての環境に広く分布し (Bamford and Baker, 2003), 水生生物を含む幅広い生物に対して種々の毒性を有し (Wislocki et al., 1986; Busby et al., 1988; Tokiwa and Ohnishi, 1986; IPCS, 2003; Michelmor et al., 1998a, b; Bacolod et al., 2013a; Curtis and Ward, 1981) であり, 化石燃料の使用の際に発生する副産物 (Nielsen, 1984) として新たに環境影響が懸念される物質群の一つと考えられる。NPAHsは大気中へ排出された後, その一部は大気降下物, 主に降雨によって水域環境に流入し (Ohe and Nukaya, 1996; Murahashi et al., 2001; Takahashi et al., 1995), 最終的には沿岸海域に流入する (De Giorgio et al., 2010; Fernandez et al., 1992; Ozaki et al., 2010) ため, 海洋生態系に及ぼす影響が懸念される。また, NPAHsと分子構造の近いピレン等の多環芳香族炭化水素 (PAHs)は紫外線 (UV)照射により, 最高一万倍以上海産生物に対する毒性が強まる (Pelletier et al., 1997) ことが知られており, 太陽光によりNPAHsの環境に及ぼす影響が増大する可能性が考えられる。そのため, 生残, 成長, 再生産などに対する一般的毒

性に加えて、光条件を考慮したNPAHsの海産生物に対する毒性影響を明らかにし、既報の環境中濃度と比較することで、現時点におけるNPAHsの海洋生態系への初期リスク評価を行うことを目的とし、本研究を実施した。

水域生態系には様々な生物が生息しており、生息する全生物に対する影響を検討するのは難しいため、栄養段階の異なる生物、藻類、甲殻類、および魚類に対する急性および慢性毒性影響を検討し、評価することが推奨されている (OECD, 2002)。そこで、本研究の試験生物として栄養段階の異なる海産の藻類、甲殻類、および魚類の代表種を選定した。海産藻類からはOECDテストガイドラインや水産庁が生態毒性試験生物として推奨しているスケルトネマを選定した。海産甲殻類からは生態毒性のモデル生物としての適性を備え、また、光照射による毒性変化を見る種として適しているシオダマリミジンコを選定した。海産魚類からは生態毒性のモデル生物としての適性を備え、我々の研究室で毒性データが豊富なアメリカ東海岸原産の海産のメダカ的一种、マミチヨグと、日本において広く種苗生産がなされ、また、水産業においても重要な海水魚種であるマコガレイを選定した。被検物質としては、人の健康や環境へ与える影響について検討されているNPAHsのうち、2-4環の芳香環を持つ多環芳香族炭化水素 (PAHs) のモノトロピレンおよびジトロピレンである10種を選定した (Table 1)。

まず、これらの4種の試験生物を用いて、選定した10種のNPAHsの急性毒性を調べた。その結果、10種のNPAHsのうち、藻類スケルトネマに対しては1-ニトロピレンが、甲殻類シオダマリミジンコに対してはジトロピレン類が、魚類マミチヨグに対しては3-ニトロフルオランテンおよび1-ニトロピレンが、マコガレイに対しては1-ニトロナフタレンがそれぞれ強い毒性を示した (Table 5)。そのため、試験生物の種類によって強い毒性を示す物質が異なることが明らかとなり、化学物質の生態系影響評価において、栄養段階が異なる複数の生物種を用いた毒性影響試験の重要性が改めて確認された。また、本研究で得られたNPAHsの急性毒性値とNPAHsと対応するPAHsの急性毒性値を比較した結果、ニトロ基の導入による毒性の変化は試験生物によって異なっており、ニトロ基の有無による単純な毒性の推定は困難であることが明らかとなった。しかし、本研究の対象物質であるNPAHsは変異原性や発ガン性などが疑われている (Wislocki et al., 1986; Busby et al., 1988; Tokiwa and Ohnishi, 1986; IPCS, 2003) が、これらの毒性を含めNPAHsの毒性は、長期暴露試験によって明ら

かになると考えられる。魚類を用いた慢性毒性試験では対照区の成長や生残などの指標を一定水準以上に維持させるため、流水式で曝露する必要がある。しかし、その強い変異原性や発ガン性のため、試験者に対する影響が懸念され、流水式による長期暴露試験の実施には大きな困難と危険性が伴う。そこで本研究では代替法としてコレステロールペレット移植試験を実施した。

急性毒性試験で両試験魚に対して唯一毒性影響が認められた1-ニトロナフタレンおよび、藻類、甲殻類および魚類の急性毒性試験で最も毒性の強かった1-ニトロピレンを被検物質とし、被検物質を含んだコレステロールペレットを抱卵中のマミチヨグメスの筋肉中に打ち込み、被検物質の受精卵への移行試験を実施した。その結果、移植区卵中1-ニトロナフタレンあるいは1-ニトロピレン濃度は、対照区よりも4週間の全実験期間中において高く維持されており (Table 7)、抱卵魚中の卵に化学物質を移行させる手法として、コレステロールペレット移植法の有効性が確認された。そのため、本手法を用いることにより、メス卵巣に移行した化学物質の胚に及ぼす影響を、より簡便に検討できることが明らかとなった。また、産卵前のマミチヨグメスに被検物質を含んだコレステロールペレットを移植し、被検物質の卵への移行を評価するとともに、結果として生じる受精卵への毒性影響を検討した。その結果、ふ化率は今回検討した被検物質に共通して最も感受性の高い指標 (Table 8, 9) であり、この指標から卵中実測濃度を基にした毒性値を明らかにした。これらの毒性値をNPAHs移行試験における対照区の卵巣および魚体中濃度比と報告された生物濃縮係数 (BCF) を用いて、水中濃度を基にした毒性値に変換した結果、1-ニトロナフタレンの最低影響濃度 (LOEC) が1.9  $\mu\text{g/L}$ 、1-ニトロピレンのLOECおよび最大無影響濃度 (NOEC) がそれぞれ3.2および8.8  $\mu\text{g/L}$ と推測された (Table 10)。これらの値はマミチヨグに対する1-ニトロナフタレンおよび1-ニトロピレンの急性毒性値、それぞれ560-1,100  $\mu\text{g/L}$ および45-290  $\mu\text{g/L}$ よりも5.1-580倍小さく、化学物質の生態系影響評価における慢性毒性試験の重要性が改めて確認された。溶解助剤を用いない急性毒性試験では、試験期間中の1-ニトロピレンの海水中濃度を0.21  $\mu\text{g/L}$ より高濃度に維持できなかった (Table 5) ことから、海水からの生物濃縮のみでは魚類再生産への影響は考えにくく、また、biomagnification factor (BMF) は0.008 (Bacolod et al., 2013b) であり、餌からの生物濃縮も小さいと推測されることから、1-ニトロピレンが魚類再生産に及ぼす可能性は



極めて小さいと推測された。しかし、本研究の被検物質であるNPAHsは環境中の物理的および化学的な作用に曝されており、NPAHsと分子構造の近いピレン等のPAHsは紫外線照射により、海産生物に対する毒性が強まる (Newsted and Giesy, 1987; Pelletier et al., 1997; Swartz et al., 1997; Huang et al., 1997) ことから、NPAHsについても同様の影響が考えられた。そのため、光条件を考慮したNPAHsの海産生物に対する毒性影響について検討した。

本研究で急性毒性試験に用いたシオダマリミジンコは光を透過し、光照射による毒性変化を反映しやすいと考えられることから、NPAHsのシオダマリミジンコの遊泳運動に対する毒性の光照射による変化について検討した。その結果、検討した10種類のNPAHsのうち9種類は、光照射により毒性が強まった。毒性の変化を検討した物質のうち、1-ニトロピレンが最も光照射により毒性が強まり、暗条件下と比較して明条件下で毒性が1,000倍以上強まったことから、1-ニトロピレンなどの数種のNPAHsは、シオダマリミジンコの遊泳を阻害する光毒性を有することが明らかとなった。また、光照射による1-ニトロピレンの毒性の変化の原因について活性酸素種 (ROS) および光分解物の発生の両面から検討した結果、ROSの生成からシオダマリミジンコの遊泳阻害が起こることを実験的に確認し、毒性変化には主にROSの生成が寄与していることが明らかとなった。光照射によるPAHsの毒性誘導を例に毒性変化のメカニズムを見てみると、光により励起されたPAHは活性種として、主にROSやPAH由来のフリーラジカルを生じ、体内に吸収された後には過酸化脂質などを生成する (Fu et al., 2012; Lampi et al., 2005; Arfstena et al., 1996)。これらは様々な細胞組織に損傷を与え、急性毒性や遺伝毒性を誘導する (Fu et al., 2012; Lampi et al., 2005; Arfstena et al., 1996)。以上のことから、本研究で確認された光照射によるNPAHsの毒性誘導機構を推測すると、1-ニトロピレンなどNPAHsを含む海水に光を照射するとROSが生成して溶液中で連鎖反応を引き起こし、細胞内の過酸化脂質の増加など試験生物内の酸化ストレスが上昇する結果、遊泳阻害に至ると考えられる。光強度の強いUVを照射すると海産甲殻類に対して致死影響が認められ (Naganuma et al., 1997; Wübben, 2000)、モクズガニの一種である *Neohelice granulata* を用いた試験では、UV-B照射によりROS、過酸化脂質、およびROSのスカベンジャーとして作用するカタラーゼの生成が誘導された (Vargas et al., 2011) ことから、光強度の強いUV照射のみでも、今回推測した光照射による毒性誘導メカ

ニズムと同様の作用により、甲殻類に対して遊泳阻害や致死などの影響を及ぼすと推測される。また、光強度依存的に過酸化脂質が生成する (Xia et al., 2013) ため、光強度が強くなると毒性誘導が増す可能性が考えられることから、干潟など自然光の光強度が強い環境に生息する生物に対する影響について、より詳細に検討する必要があると考えられる。

NPAHsの海産生物に対する急性毒性値から推定した予測無影響濃度 (PNEC, Table 5)、コレステロールペレット移植試験の結果から推測したNPAHsの海水実測濃度を基にした慢性毒性値 (Table 10)、および海産甲殻類の光照射による毒性誘導を考慮した毒性影響濃度 (Table 11)、と既報の水中実測濃度およびモデリングによる水中推定濃度を比較し、実環境における海産生物に及ぼすリスクを検討した。コレステロールペレット移植法を用いて推定した水中濃度を基にした慢性毒性値については、通常のリスク評価で用いられる毒性値と大幅に異なるためこれを参考値とし、PNEC算出には用いなかった。

1-ニトロナフタレン (MW: 173.17) の最小急性毒性値 (マミチヨグに対する急性毒性値  $560 \mu\text{g/L}$ ) から得られたPNEC ( $5,600 \text{ ng/L}$ , Table 5)、コレステロールペレット移植法を用いて推定した水中濃度を基にした慢性毒性値LOEC ( $1.9 \mu\text{g/L}$ , Table 10)、および光条件下におけるシオダマリミジンコノープリウス期幼生試験において遊泳阻害が認められた濃度 ( $10 \mu\text{M}$ ,  $1,700 \mu\text{g/L}$ , Table 11) と比較して、環境水中における最高検出濃度 (日本河川水中濃度  $3.7 \text{ ng/L}$ , Murahashi et al., 2001) や環境動態モデルを用いて推定されたカリフォルニア地域の水の濃度 ( $1.0 \text{ ng/L}$ , Yaffe et al., 2001) およびミシガン湖水の濃度 ( $11.7 \text{ ng/L}$ , Huang and Batterman, 2014) は100倍以上低い濃度であった。コレステロールペレット移植法の試験結果から推定した毒性値はLOECしか得られていないが、1-ニトロナフタレンのNOECが上記水中LOEC推定値  $1.9 \mu\text{g/L}$  の  $1/100$  であることは考えにくく、むしろ  $1.9 \mu\text{g/L}$  に近い値であることが考えられる。また、卵内濃度から水中濃度LOECを推定していることから、不確実性の高い可能性がある。これを考慮して上記で推定したLOECを安全係数10あるいは100で除したとしても、依然として環境水中最高検出濃度や推定濃度の方が低い値である。これらのことから、光による毒性変化や慢性毒性値の不確実性を考慮しても、海産生物に影響を及ぼす可能性は低いと想定される。

2-ニトロフルオレン (MW: 211.22) の最小急性毒性値 (マミチヨグに対する急性毒性値  $>4.6 \mu\text{g/L}$ )

から得られたPNEC (>46 ng/L, Table 5), および光条件下におけるシオダマリミジンコノープリウス期幼生試験において遊泳阻害が認められた濃度 (1-10  $\mu\text{M}$ , 210-2,100  $\mu\text{g/L}$ , Table 11) と比較して, 環境動態モデルを用いて推定されたカリフォルニア地域の水中濃度 (2.2 ng/L, Yaffe et al., 2001) およびミシガン湖水中濃度 (8.7 ng/L, Huang and Batterman, 2014) は少なくとも5倍以上低い濃度であった。1,5-ジニトロナフタレンの (MW: 218.17) の最小急性毒性値 (マミチヨグに対する急性毒性値 >38  $\mu\text{g/L}$ ) から得られたPNEC (>380 ng/L, Table 5), および光条件下におけるシオダマリミジンコノープリウス期幼生試験において遊泳阻害が認められた濃度 (10  $\mu\text{M}$ , 2,200  $\mu\text{g/L}$ , Table 11) と比較して, 日本河川中の検出濃度 (10 ng/L, 高橋ら, 1995) は少なくとも30倍以上低い濃度であった。6-ニトロクリセン (MW: 273.29) の最小急性毒性値 (マミチヨグに対する急性毒性値 >0.033  $\mu\text{g/L}$ ) から得られたPNEC (>0.33 ng/L, Table 5), および光条件下におけるシオダマリミジンコノープリウス期幼生試験において遊泳阻害が認められた濃度 (1-10  $\mu\text{M}$ , 270-2,700  $\mu\text{g/L}$ , Table 11) と比較して, 環境動態モデルを用いて推定されたミシガン湖水中濃度 (0.11 ng/L, Huang and Batterman, 2014) は少なくとも3倍以上低い濃度であった。これらの3種のNPAHsは何れの急性毒性試験においても, 試験濃度の範囲で50%以上の藻類生長阻害, 甲殻類遊泳阻害あるいは魚類死亡が認められず, 急性毒性値を試験最高濃度以上として算出しているため, PNECを低く推定していると考えられる。しかし, 実測および推定された環境水中濃度はこれらのPNECを下回っており, 光による毒性変化を考慮しても, これらのNPAHsは現在の環境水中濃度で海産生物に影響を及ぼす可能性は低いと想定される。

1-ニトロピレン (MW: 247.26) のコレステロールペレット移植法の結果から推定した水中濃度を基にした慢性毒性値NOECおよびLOEC (3.2 および 8.8  $\mu\text{g/L}$ , Table 10) および光条件下におけるシオダマリミジンコノープリウス期幼生試験において遊泳阻害が認められた濃度 (0.01-10  $\mu\text{M}$ , 2.5-2,500  $\mu\text{g/L}$ , Table 11) と比較して, 環境水中における最高検出濃度 (日本河川水中濃度1.0 ng/L, Ohe and Nukaya, 1996) や環境動態モデルを用いて推定されたカリフォルニア地域の水中濃度 (2.9 ng/L, Yaffe et al., 2001) およびミシガン湖水中濃度 (0.17 ng/L, Huang and Batterman, 2014) は100倍程度低い濃度であった。コレステロールペレット移植法の試験結果から推定した慢性毒性値は卵内濃度から水中濃度の慢性毒性値を推定している

ことから, 不確実性の高い可能性がある。これを考慮して上記で推定したNOECあるいはLOECを安全係数10あるいは100で除したとしても, 依然として環境水中最高検出濃度や推定濃度の方が下回っている。これらのことから, 光による毒性変化や慢性毒性値の不確実性を考慮しても, 海産魚類の再生産や甲殻類に影響を及ぼす可能性は低いと想定される。しかし, 1-ニトロピレンの最小急性毒性値 (スケレトネマに対する急性毒性値0.42  $\mu\text{g/L}$ ) を安全係数100で除したPNEC (4.2 ng/L, Table 5) は上記の水中最高検出濃度や水中推定濃度より高いもののほぼ同等の濃度であるため, 1-ニトロピレンは海産生物, 特に海産藻類に影響を及ぼす可能性が想定され, この物質の海洋環境に関するリスクについてさらに研究を進めていく必要がある。また, その他の5物質については環境水中濃度が報告されておらず, これらのNPAHsの海産甲殻類に及ぼす影響を評価することはできなかった。

本研究の成果は, 以下のようにまとめることができる。

1. NPAHsの海産生物に対する急性毒性は生物の種類により強い毒性を示す物質が異なる。
2. NPAHsの急性毒性値とNPAHsと対応するPAHsの急性毒性値を比較した結果, ニトロ基の導入による毒性の変化は試験生物によって異なり, 一定の傾向は認められない。
3. NPAHsなど長期暴露試験の実施に危険性が伴う物質の魚類に対する慢性影響評価には, コレステロールペレット移植法を用いて, メス卵巣に移行した化学物質の胚に及ぼす影響を見る方法が有効である。
4. NPAHsが移行した魚類受精卵への毒性影響を検討した結果, ふ化率が最も感受性の高い指標である。
5. 魚類に対する急性毒性値と慢性毒性値を比較した結果, 慢性毒性値が急性毒性値よりも5-500倍程度小さい。
6. 1-ニトロピレンなど数種のNPAHsは, 甲殻類の遊泳を阻害する光毒性を有する。
7. 光照射による1-ニトロピレンの毒性変化は主に活性酸素種 (ROS) の生成が寄与している。
8. 1-ニトロピレンなどNPAHsを含む海水に光を照射するとROSが生成し, 細胞内の過酸化脂質の増加など試験生物内の酸化ストレスが上昇する結果, 甲殻類の遊泳阻害に至る毒性誘導メカニズムが想定される。
9. 1-ニトロナフタレン, 2-ニトロフルオレン,

1,5-ジニトロナフタレン, および6-ニトロクリセンについては, 光による毒性変化や慢性毒性値の不確実性を考慮しても, 現在の海水中濃度で海産生物に影響を及ぼす可能性は低いと想定される。

10. 1-ニトロピレンについては光による毒性変化や慢性毒性値の不確実性を考慮しても, 現在の海水中濃度で海産魚類の再生産や甲殻類に影響を及ぼす可能性は低いと想定されるが, 海産生物, 主に藻類に影響を及ぼす可能性がある。

人類は様々な種類の化学物質を使用することにより繁栄を続けているが, 使用済み化学物質やその分解物は環境に移行し, 様々な形で環境生態系に影響を及ぼしている。本研究では, 人類が莫大に使用する化石燃料の使用時に発生する副産物に着目し, その中でも新たに環境影響が懸念される物質群の一つと考えられるNPAHsの海洋生態系への初期リスク評価を行い, 今回検討した物質の中では1-ニトロピレンが海洋環境に及ぼすリスクが高いことを明らかにした。しかし, 化石燃料の使用時に発生する副産物の海洋生態系への影響についてはナフタレンやピレンなど代表的なPAHsについてはかなり研究が進んでいるものの, 本研究で研究対象としたNPAHsや水酸化PAHs, アルキルPAHsなど芳香環に様々な官能基がついた物質群については, 環境モニタリングおよび生物影響に関する情報が共に少なく, リスク評価が進まないままである。本研究において検討した10種のNPAHsのうち5種については環境水中濃度が報告されておらず, これらのNPAHsの海洋環境に及ぼすリスクを評価できなかった。今後, 海洋環境に及ぼすリスクを評価するため, NPAHsを含む芳香環に様々な官能基がついた物質群の環境モニタリングを行うとともに, その他のPAHs関連物質についても海産生物に及ぼす影響を検討し, リスクが高い物質を早急に明らかにしていく必要がある。本研究では栄養段階の異なる4種の生物を用いてNPAHsの急性毒性を検討したが, 生物の種類により強い毒性を示す物質が異なることが示された。PAHs関連物質についてはNPAHsと同様に生物の種類により強い毒性を示す物質が異なる可能性があることから, これから生態毒性情報を集める際には栄養段階の異なる複数の生物に対する毒性影響を検討する必要がある。また, PAHs関連物質の中にはNPAHsと同様に変異原性や発がん性を示す物質も含まれる。こうした物質についても本研究で確立したコレステロールペレット移植法を用いることにより, 長期暴露試験の実施に伴う危険性を回避しつつ, 魚類に対する慢性

影響評価を比較的簡便に行うことが可能である。本研究では1-ニトロピレンなど数種のNPAHsは甲殻類の遊泳を阻害する光毒性を有し, 光照射による1-ニトロピレンの毒性変化は主に活性酸素種 (ROS) の生成が寄与することを明らかにした。この光照射による毒性誘導メカニズムは光強度の強い光照射による甲殻類の遊泳阻害や致死などの影響とほぼ同じメカニズムと想定される。また, 生体内の酸化ストレスの指標である過酸化脂質は光強度依存的に生成するため, 光強度が強くなると毒性誘導が増す可能性が考えられる。干潟など自然光の光強度が強い環境に生息する生物に対するNPAHsの影響について, より詳細に検討する必要があるといえる。本研究で得られた研究成果はこれまでほとんど研究例のないNPAHsの海洋生態系に対する環境影響評価に繋がるものであり, 主に沿岸域の海洋環境の保全に有益な情報となることが期待される。

#### 謝辞

本研究をまとめるにあたって適切なるご助言と懇切なご指導を賜りました鹿児島大学水産学部小山次朗名誉教授に心より感謝の意を表します。また, 博士課程で貴重なご助言をいただいた, 鹿児島大学水産学部前田広人教授, 宇野誠一准教授, 吉川 毅准教授, 佐賀大学農学部 上野大介准教授にも感謝致します。

本研究は, 著者が瀬戸内海区水産研究所において, 海産藻類を用いた毒性試験法の確立に携わる過程から開始し, 試験生物として甲殻類および魚類を増やしながら実施しました。共同研究者として毒性試験の実施において多大なご協力をいただき, また, 研究を遂行する上で多くの貴重なご助言を賜った藤井一則博士 (現東北区水産研究所業務推進部長) に深甚なる謝意を表します。

海産藻類の毒性試験法について懇切丁寧にご指導いただき, また研究を遂行する上で多くの貴重なご助言を賜った東北区水産研究所の奥村裕博士に厚くお礼申し上げます。また, 被検物質の測定法などについて多くの貴重なご助言および示唆に富むご教授をいただきました中央水産研究所業務推進課長市橋秀樹博士には謹んで御礼申し上げます。

研究の遂行に際して終始懇篤なるご指導並びに絶大なるご支援を賜った元瀬戸内海区水産研究所化学環境部長有馬郷司博士, 元中央水産研究所山田 久博士, 元水産総合研究センター研究推進部研究主幹岸田 達博士には謹んでお礼申し上げます。また, 研究の取りまとめに際し絶大なるご支援を賜った元水産総合研究センター研究推進部長高柳和史博士, 元水産工学研究

所業務推進部長寺脇利信博士ならびに瀬戸内海区水産研究所環境保全研究センター桑原隆治博士には謹んでお礼申し上げます。

研究に際して海産生物を用いた毒性試験の実施、被検物質の測定法、および試験結果の解析において多大なご指導やご協力をいただき、また、研究を遂行する上で多くの貴重なご助言を賜った水産研究・教育機構経営企画部広報コーディネーター角埜彰博士、瀬戸内海区水産研究所海産無脊椎動物研究センター小島大輔博士、瀬戸内海区水産研究所環境保全研究センター持田和彦博士、伊藤克敏博士には厚くお礼申し上げます。

研究の遂行において多くのご教示や示唆に富んだ討議をいただいた田中博之博士、河野久美子氏をはじめ瀬戸内海区水産研究所環境保全研究センター化学物質グループの職員の方々には厚く感謝の意を表します。最後に、瀬戸内海区水産研究所環境保全研究センター化学物質グループの平本千秋氏、高場由美子氏および正田美紀氏に心から御礼申し上げます。

## 文献

- Albinet A., Leoz-Garziandia E., Budzinski H., and Viilenave E., 2006: Simultaneous analysis of oxygenated and nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons on standard reference material 1649a (urban dust) and on natural ambient air samples by gas chromatography-mass spectrometry with negative ion chemical ionisation. *J. Chromatogr.*, **1121**, 106-113.
- American Society of Testing Materials (ASTM), 1994: Standard guide for conducting static 96-h toxicity tests with microalgae. Annual book of ASTM Standards. ASTM E1218-90. Philadelphia, PA.
- American Society for Testing and Materials (ASTM), 2003: Reference Solar Spectral Irradiance: Air Mass 1.5 ; ASTM G173-03 Reference Spectra ASTM 2003, URL: <http://rredc.nrel.gov/solar/spectra/am1.5/>.
- APHA/AWWA/WPCF (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation), 1998: 8111 Biostimulation (algal productivity), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (20th edition). American Public Health Association, Washington. USA.
- Arfstena D. P., Schaeffer D. J., and Mulveny D. C., 1996: The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals and plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **33**, 1-24.
- Armstrong P. B., and Child J. S., 1965: Stages in the normal development of *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Bull.*, **128**, 143-168.
- Atkinson R., and Arey J., 1994: Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: formation of atmospheric mutagens. *Environ. Health Perspect.*, **102**, 117-126.
- Bacolod E. T., Uno S., Tanaka H., Miki S., Kokushi E., Fukunaga M., and Koyama J., 2013a: Bioconcentration of waterborne nitroarenes in marbled flounder *Pleuronectes yokohamae*. *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, **16**, 91-105.
- Bacolod E. T., Uno S., Tanaka H., and Koyama J., 2013b: Micronuclei and other nuclear abnormalities induction in erythrocytes of marbled flounder *Pleuronectes yokohamae*, exposed to dietary nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, **16**, 79-89.
- Bamford H. A., and Baker J. E., 2003: Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and sources in urban and sub-urban atmospheres of Mid-Atlantic region. *Atmos. Environ.*, **37**, 2077-2091.
- Botta C., Di Giorgio C., Sabatier A. S., and De Méo M., 2009: Effects of UVA and visible light on the photogenotoxicity of benzo [a] pyrene and pyrene. *Environ. Toxicol.*, **24**, 492-505.
- BP public limited company (p.l.c.), 2014: BP Statistical Review of World Energy, BP p.l.c. London, UK, URL: <http://www.bp.com/en/global/corporate/about-bp/energy-economics/statistical-review-of-world-energy.html>.
- Burnett K. G., Bain L. J., Baldwin W. S., Callard G. V., Cohen S., Di Giulio R. T., Evans D. H., Gomez-Chiarri M., Hahn M. E., Hoover C. A., Karchner S. I., Katoh F., MacLachy D. L., Marshall W. S., Meyer J. N., Nacci D. E., Oleksiak M. J., Rees B. B., Singer T. P., Stegeman J. J., Towle D. W., Van Veld P. A., Vogelbein W. K., Whitehead A., Winn R. N., and Crawford D. L., 2007: *Fundulus* as the

- premier teleost model in environmental biology: Opportunities for new insights using genomics, *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*, **2**, 257-286.
- Busby W. F. Jr., Stevens E. K., Kellenbach E. R., Cornelisse J., and Lugtenburg J., 1988: Dose-response relationships of the tumorigenicity of cyclopenta [c,d] pyrene, benzo [a] pyrene and 6-nitrochrysene in a newborn mouse lung adenoma bioassay. *Carcinogenesis*, **9**, 741-746.
- Crim L. W., Sherwood N. M., and Wilson C. E., 1988: Sustained hormone release. II. Effectiveness of LHRH analog (LHRHa) administration by either single time injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout. *Aquaculture*, **74**, 87-95.
- Curtis M. W., and Ward C. H., 1981: Aquatic toxicity of forty industrial chemicals: Testing in support of hazardous substance spill prevention regulation. *J. Hydrology*, **51**, 359-367.
- 独立行政法人水産総合研究センター, 2014: 平成24年度 栽培漁業・海面養殖用種苗の生産, 入手・放流実績 (全国) ~総括・動向編~, 独立行政法人水産総合研究センター, 109pp.
- Dawson G. W., Jennings A. L., Drozdowski D., and Rider E., 1975-76: The acute toxicity of 47 industrial chemicals to fresh and saltwater fishes. *J. Hazard. Mater.*, **1**, 303-318.
- De Giorgio C., Liu W., Sarrazin L., Wafo E., Moreau X., De Jong L., Thiery A., and De Meo M., 2010: Organic pollution and genotoxicity of sediments of the Palun marshes (Berre Lagoon, France). *J. Environ. Quality*, **39**, 558-567.
- Fent K., 1996: Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.*, **26**, 1-117.
- Fernandez P., Grifoll M., Solanas A. M., Bayona J. M., and Albaiges J., 1992: Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 817-829.
- Fu P. P., Xia Q., Xin S., and Yu H., 2012: Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) — light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. *J. Environ. Sci. Health. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, **30**, 1-41.
- Guillard R. R., and Ryther J. H., 1962: Studies of marine diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, **8**, 229-239.
- 堀 秀夫, 立石晶浩, 山田 久, 2001: 海産動物プランクトンによる有害物質急性毒性試験法の開発, 環境毒性学会誌, **4**, 73-86.
- 堀 秀夫, 2010: I-2 シオダマリミジンコ幼生の遊泳阻害試験法. 「海産生物毒性試験指針」, 水産庁, pp. 16-24.
- Hamilton M., Russo R., and Thurston R., 1977: Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, **11**, 714-719.
- Hasei T., Watanabe T., and Hirayama T., 2006: Determination of 3,6-dinitrobenzo [e] pyrene in surface soil and airborne particles by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, **1135**, 65-70.
- Hashimoto S., Bessho H., Hara A., Nakamura M., Iguchi T., and Fujita K., 2000: Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan, *Mar. Environ. Res.*, **49**, 37-53.
- Hayakawa K., Murahashi T., Butoh M., and Miyazaki M., 1995: Determination of 1,3-, 1,6- and 1,8-dinitropyrenes and 1-nitropyrene in urban air by high-performance liquid chromatography using chemiluminescence detection. *Environ. Sci. Technol.*, **29**, 928-932.
- Huang L., 2014: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitro-PAHs and petroleum biomarkers in lake Michigan, the degree of Doctor of Philosophy in the University of Michigan, pp. 222.
- Huang L., and Batterman S. A., 2014: Multimedia model for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and nitro-PAHs in Lake Michigan. *Environ. Sci. Technol.*, **48**, 13817-13825.
- Huang X. D., Krylov S. N., Ren L., Mcconkey B. J., Dixon D. G., and Greenberg B. M., 1997: Mechanistic quantitative structure-activity relationship model for the photoinduced toxicity

- of polycyclic aromatic hydrocarbons: II. An empirical model for the toxicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons to the duckweed *Lemna gibba* L. G-3. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 2296-2303.
- Hutchinson T. H., Williams T. D., and Eagles G. J., 1994: Toxicity of cadmium, hexavalent chromium, and copper to marine fish larvae (*Cyprinodon variegatus*) and copepods (*Tisbe battagliai*). *Mar. Environ. Res.*, **38**, 275-290.
- Ibuki Y., and Goto R., 2002: Phototoxicity of benzo [a] pyrene by ultraviolet A irradiation: induction of apoptosis in Jurkat cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **11**, 101-109.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2001: Technological and economic potential of greenhouse gas emissions reduction, in "Third Assessment Report: Climate Change 2001 Mitigation", Intergovernmental Panel on Climate Change, Geneva, Switzerland, URL: <http://www.ipcc.ch/ipccreports/tar/wg3/index.php?idp=89>.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2007a: Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of working groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the IPCC (eds. Core Writing Team, Pachauri, R.K. and Reisinger, A.). IPCC, Geneva, Switzerland, 104 pp, URL: [http://www.ipcc.ch/publications\\_and\\_data/ar4/syr/en/contents.html](http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/syr/en/contents.html).
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2007b: Climate Change 2007: Contribution of working group I to the Fourth Assessment Report of the IPCC (eds. Solomon S., Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis M., Averyt K.B., Tignor M., Miller H.L.) Cambridge University Press, NY, USA, 130-234, International Agency for Research on Cancer (IARC), URL: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS), 2003: Selected nitro- and nitro-oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental health criteria 229, Geneva, Switzerland.
- 角埜 彰, 2010: II-2 魚類マミチヨグの初期生活段階毒性試験法. 「海産生物毒性試験指針」, 水産庁, pp. 60-76.
- 角埜 彰, 持田和彦, 藤井一則, 隠塚俊満, 河野久美子, 市橋秀樹, 田中博之, 2006: 多環芳香族化合物及び油処理剤の海産生物の初期発生に対する影響評価, 平成17年度「流出油及び油処理剤の海産生物に対する有害性評価に関する研究」報告書, pp. 5-43.
- 環境庁環境保健部環境安全課, 2000: 多環芳香族炭化水素 (PAHs) の分析法, 平成10年度化学物質分析法開発調査報告書 (その2), 70pp.
- Kawanaka Y., Sakamoto K., Wang N., and Yun S. J., 2007: Simple and sensitive method for determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel exhaust particles by gas chromatography-negative ion chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **1163**, 312-317.
- Kojima H., Hirotsu M., Nakatsubo N., Kikuchi K., Urano Y., Higuchi T., Hirata Y., and Nagano T., 2001: Bioimaging of nitric oxide with fluorescent indicators based on the rhodamine chromophore. *Anal. Chem.*, **73**, 1967-1973.
- Kuo C. T., Chen H. W., and Lin S. T., 2003: Trace determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons using liquid chromatography with on-line electrochemical reduction and fluorescent detection. *Analytica. Chimica. Acta*, **482**, 219-228.
- Lampi M. A., Gurska J., McDonald K. I., Xie F., Huang X. D., Dixon D. G., and Greenberg B. M., 2005: Photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna*: ultraviolet-mediated effects and the toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon photoproducts. *Environ. Toxicol. Chem.*, **25**, 1079-1087.
- Larssen T., and Carmichael G. R., 2000: Acid rain and acidification in China: the importance of base cation deposition, *Environ. Pollut.*, **110**, 89-102.
- Lee K. W., Raisuddin S., Hwang D. S., Park H. G., Dahms H. U., Ahn I. Y., and Lee J. S., 2008: Two-generation toxicity study on the copepod model species *Tigriopus japonicus*. *Chemosphere*, **72**, 1359-1365.
- Leung K. M. Y., Morrill D., Wheeler J. R., Whitehouse P., Sorokin N., Toy R., Holt M., and Crane M., 2001: Can saltwater toxicity be predicted from freshwater data. *Mar. Poll. Bull.*, **42**, 1007-1013.
- Levitan W. M., and Taylor M. H., 1979: Physiology

- of salinity-dependent naphthalene toxicity in *Fundulus heteroclitus*. *J. Fish. Res. Board. Can.*, **36**, 615-620.
- Likens G. E., and Bormann F. H., 1974: Acid rain: a serious regional environmental problem, *Science*, **184**, 1176-1179.
- Likens G. E., Driscoll C. T., and Buso D. C., 1996: Long-term effects of acid rain: response and recovery of a forest ecosystem, *Science*, **272**, 244-246.
- Loft S., and Poulsan H. E., 1996: Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.*, **74**, 297-312.
- Machida R. J., Miya M. U., Nishida M., and Nishida S. 2002: Complete mitochondrial DNA sequence of *Tigriopus japonicus* (Crustacea: Copepoda) *Mar. Biotechnol.*, **4**, 406-417.
- Machlin L. J., and Bendich A., 1987: Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.*, **1**, 441-445.
- Marcial H. S., Hagiwara A., and Snell T. W., 2003: Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**, 3025-30.
- Mitchelmore C. L., and Chipman J. K., 1998: Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Aquat. Toxicol.*, **41**, 161-182.
- Mitchelmore C. L., Birmelin C., Livingstone D. R., and Chipman J. K., 1998: Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the "comet" assay. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **41**, 51-58.
- Morris D. P., Zagarese H., Williamson C. E., Balseiro E. G., Hargreaves B. R., Modenutti B., Moeller R., and Queimalinos C., 1995: The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.*, **40**, 1381-1391.
- Murahashi T., Ito M., Kizu R., and Hayakawa K., 2001: Determination of nitroarenes in precipitation collected in Kanazawa, Japan. *Water Res.*, **35**, 3367-3372.
- 農林水産省, 農薬取締法, URL : <http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S23/S23HO082.html>.
- Naganuma T., Inoue T., and Uye S., 1997, Photoreactivation of UV-induced damage to embryos of a planktonic copepod. *J. Plankton Res.*, **19**, 783-787.
- Newsted J. L., and Giesy J. P., 1987: Predictive models for photoinduced acute toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna*, Strauss (Cladocera, Crustacea). *Environ. Toxicol. Chem.*, **6**, 445-46.
- Nielsen T., 1984: Reactivity of polycyclic aromatic hydrocarbons towards nitrating species. *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 157-163.
- 奥村 裕, 隠塚俊満, 2010 : I-1 植物プランクトン 生長阻害試験法. 「海産生物毒性試験指針」, 水産庁, pp. 1-15.
- Ohe T., and Nukaya H., 1996: Genotoxic activity of 1-nitropyrene in water from the Yodo River, Japan. *Sci. Total. Environ.*, **181**, 7-12.
- Onduka T., Mochida K., Harino H., Ito K., Kakuno A., and Fujii K., 2010: Toxicity of metal pyrithione photodegradation products to marine organisms with indirect evidence for their presence in seawater. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **58**, 991-997.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 1992: Fish, acute toxicity test. Guideline 203. Paris, France.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 1998: *Daphnia magna* Reproduction Test. Guideline 211. Paris, France.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2000. Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23. Paris, France.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2001: Guidance document on the use of the harmonized system for the classification of chemicals which are hazardous for the aquatic environment. Series on Testing and Assessment No. 27. Paris, France.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2002: 4.2 Guidance for the initial assessment of aquatic effects. Manual for Investigation of HPV Chemicals. Paris, France.
- Organisation for Economic Co-operation and

- Development (OECD). 2004: *Daphnia* sp., acute immobilisation test. Guideline 202. Paris, France.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2006a: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Guideline 201. Paris, France.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2006b: *Lemna* sp. growth inhibition test. Guideline 221. Paris, France.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2008: *Daphnia magna* reproduction test. Guideline 211. Paris, France.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2013: Fish, early-life stage toxicity test. Guideline 210. Paris, France.
- Ozaki N., Takemoto N., and Kindaichi T., 2010: Nitro-PAHs and PAHs in atmospheric particulate matters and sea sediments in Hiroshima Bay Area, Japan. *Water Air Soil Pollut.*, **207**, 263-271.
- Pelletier M. C., Burgess R. M., Ho K. T., Kuhn A., McKinney R. A., and Ryba S. A., 1997: Phototoxicity of individual polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum to marine invertebrate larvae and juveniles. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 2190-2199.
- Pinkney A. E., Wright D. A., and Hughes G. M., 1989: A morphometric study of the effects of tributyltin compounds on the gills of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *J. Fish Biology*, **34**, 665-677.
- Raisuddin S., Kwok K. W. H., Leung K. M. Y., Schlenk D., and Lee J. S., 2007: The copepod *Tigriopus*: A promising marine model organisms for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquat Toxicol.*, **83**, 161-173.
- Rand G. M., Well P. G., and McCarty L. S., 1995: Chapter 1 - Introduction to aquatic toxicology. in "Fundamentals of Aquatic Toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment" (ed. by Rand G. M.), Taylor & Francis, Washington, D.C., pp. 3-67.
- Reisener A., Stöckle B., and Snelthage R., 1995: Deterioration of copper and bronze caused by acidifying air pollutants, *Water Air Soil Pollut.*, **85**, 2701-2706.
- 資源エネルギー庁, 2014: 平成25年度エネルギーに関する年次報告 平成26年6月, 経済産業省, URL: <http://www.enecho.meti.go.jp/about/whitepaper/2014pdf/>
- 水産庁, 2010: 海産生物毒性試験指針, 水産庁増殖推進部, 160pp.
- Schindler D. W., 1988: Effects of acid rain on freshwater ecosystems. *Science*, **239**, 149-157.
- Schults T. W., and Moulton B. A., 1985: Structure-activity relationships for nitrogen-containing aromatic molecules. *Environ. Toxicol. Chem.*, **4**, 353-359.
- Setsukinai K., Urano Y., Kakinuma K., Majima H.J., and Nagano T., 2003: Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J. Biol. Chem.*, **278**, 3170-3175.
- Shimizu A., 1997: Reproductive cycles in a reared strain of the mummichog, a daily spawner. *J. Fish. Bio.*, **51**, 724-737.
- Stadtman E. R., and Berlett B. S., 1997: Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 485-494.
- Swartz R. C., Ferraro S. P., Lamberson J. O., Cole F. A., Ozretich R. J., Boese B. L., Schults D. W., Behrenfeld M., and Ankley G. T., 1997: Photoactivation and toxicity of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in marine sediment. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 2151-2157.
- 高久 浩, 2010: II-1 シオダマリミジンコの繁殖阻害試験法. 「海産生物毒性試験指針」, 水産庁, pp. 53-59.
- 高野秀明, 1968: かわった養殖, シオダマリミジンコ, 養殖, **5**, 105-108.
- 高橋保雄, 中川純一, 細川奈津子, 浅野正博, 森田昌敏, 1995: ある河川水におけるモニタリング物質の検索及び濃度レベル, 環境化学, **5**, 207-214.
- Takahashi Y., Nakagawa J., Hosokawa N., Asano M., and Morita M., 1995: Identification and determination of organic compounds in a river water. *J. Environ. Chem.*, **5**, 207-214.
- Tedetti M., and Sempéré R., 2006: Penetration of ultraviolet radiation in the marine environment. a review. *Photochem. Photobiol.*, **82**, 389-397.
- Thimijan R. W., and Heins R. D., 1983: Photometric, radiometric, and quantum light units of measure



- a review of procedures for interconversion. *HortScience*, **18**, 818-822.
- Tokiwa H., and Ohnishi Y., 1986: Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. *Crit. Rev. Toxicol.*, **17**, 23-60.
- Tyrrrell R. M., 2000: Role for singlet oxygen in biological effects of ultraviolet A radiation. *Methods Enzymol.*, **319**, 290-296.
- Uno S., Tanaka H., Miki S., Kokushi E., Ito K., Yamamoto M., and Koyama J., 2011: Bioaccumulation of nitroarenes in bivalves at Osaka Bay, Japan. *Mar. Pollut. Bull.*, **63**, 477-481.
- US EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 1971: Algal assay, Bottle test. Corvallis, O. R.: National Eutrophication Research Program, Pacific Northwest Environmental Research Laboratory.
- US.EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 1974: Marine algal assay procedure bottle test. Corvallis, O. R.: Eutrophication and Lake Restoration Branch National Environmental Research Center.
- Vargas, M. A., Geihs, M. A., Maciel, F. E., Cruz, B. P., Nery, L. E. M., and Allodi, S., 2011: The effects of UV radiation on the visual system of the crab *Neohelice granulata*: a protective role of melatonin. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, **154**, 427-434.
- Vasconcellos P. D. C., Ccoyllo O. S., Balducci C., Mabilia R., and Cecinato A., 2008: Occurrence and concentration levels of nitro-PAH in the air of three Brazilian cities experiencing different emission impacts. *Water Air Soil Pollut.*, **190**, 87-94.
- Voeikov V., 2001: Reactive oxygen species, water, photons and life. *Riv. Biol.*, **94**, 237-258.
- Walker M., Zabel E., Ackerman G., Balk L., Wright P., and Tillitt D., 1996: Fish egg injection as an alternative exposure route for early life stage toxicity studies: description of two unique methods. In "Techniques in Aquatic Toxicology" (ed. Ostrander G. K.). Lewis, New York, USA, pp. 41-72.
- Walsh G. E., McLaughlan L. L., Lores E. M., Louie M. K., and Deans C. H., 1985: Effects of organotins on growth and survival of two marine diatoms, *Skeletonema costatum* and *Thalassiosira pseudonana*. *Chemosphere*, **14**, 383-392.
- Walther G. R., Post E., Convey P., Menzel A., Parmesan C., Beebee T. J., Fromentin J. M., Hoegh-Guldberg O., and Bairlein F., 2002: Ecological responses to recent climate change. *Nature*, **416**, 389-395.
- Ward G. S., Cramm G. C., Parrish P. R., Trachman H., and Slesinger A., 1981: Bioaccumulation and chronic toxicity of bis (tributyltin) oxide (TBTO): tests with a saltwater fish, in Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fourth Conference, ASTM STP 737 (ed. by Branason D. R., Dickson K. L.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 183-200.
- Wislocki P. G., Bagan E. S., Lu A.Y. H., Dooley K. L., Fu P. P., Han-Hsu H., Beland F. A., and Kadlubar F. F., 1986: Tumorigenicity of nitrated derivatives of pyrene, benz [a] anthracene, chrysene and benzo [a] pyrene in the newborn mouse assay. *Carcinogenesis*, **7**, 1317-1322.
- Wübben D. L., 2000: UV-induced mortality of zoea I larvae of brown shrimp *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758). *J. Plankton Res.*, **22**, 2095-2014.
- Xia Q., Chou M. W., Yin J. J., Howard P. C., Yu H., and Fu P. P., 2006: Photoirradiation of representative polycyclic aromatic hydrocarbons and twelve isomeric methylbenz [a] anthracene with UVA light: formation of lipid peroxidation. *Toxicol. Ind. Health*, **22**, 147-56.
- Xia Q., Yin J. J., Zhao Y., Wu Y. S., Wang Y. Q., Ma L., Chen S., Sun X., Fu P. P., and Yu H., 2013: UVA hotoirradiation of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons-induction of reactive oxygen species and formation of lipid peroxides. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **10**, 1062-84.
- Yaffe D., Cohen Y., Arey J., and Grosovsky A. J., 2001: Multimedia analysis of PAHs and nitro-PAH daughter products in the Los Angeles Basin. *Risk Anal.*, **21**, 275-294.
- Yu H., 2002: Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and phototoxicity. *J. Environ. Sci. Health. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, **20**, 149-183.

## 和文要旨

ニトロアレーン (NPAHs) は主に化石燃料の不完全燃焼により非意図的に生成し、最終的には海域環境に流入すると考えられており、海産生物に対する影響が懸念されている。また、NPAHsと分子構造の近いピレン等の多環芳香族炭化水素は紫外線照射により、海産生物に対する毒性が強まることが知られており、太陽光によりNPAHsの環境に及ぼす影響が増大する可能性が考えられる。そのため、生残、成長、再生産などに対する一般的毒性に加えて、光条件を考慮したNPAHsの海産生物に対する毒性影響を明らかにし、既報の環境中濃度と比較することで、現時点におけるNPAHsの海洋生態系への初期リスク評価を行うことを目的とし、本研究を実施した。

栄養段階の異なる、海産藻類スケルトネマ、甲殻類シオダマリミジンコ、魚類マミチヨグおよびマコガレイを供試生物とし、10種のNPAHsを被検物質として急性毒性試験を行った結果、試験生物によって物質ごとの感受性が異なり、生物の種類により強い毒性を示す物質が異なることを明らかにした。1-ニトロナフタレンまたは1-ニトロピレンを含んだコレステロールペレットを抱卵中のマミチヨグメスの筋肉中に打ち込み、受精卵への移行試験を実施した結果、抱卵魚中の卵に化学物質を移行させる手法として、コレステロールペレット移植法の有効性を確認した。同手法

を用いて、被検物質が移行した受精卵への毒性影響を検討した結果、いずれの物質もふ化率に最も顕著な影響を及ぼし、受精卵中の被検物質濃度を基に慢性毒性値を明らかにした。NPAHsのシオダマリミジンコに対する毒性の光照射による変化について検討した結果、検討した10種類のNPAHsのうち9種類は、光照射により毒性が強まった。毒性の変化を検討した物質のうち、1-ニトロピレンが最も光照射により毒性が強まり、暗条件下と比較して明条件下で毒性が千倍以上強まった。光照射による1-ニトロピレンの毒性の変化の原因について活性酸素種 (ROS) および光分解物の発生の両面から検討した結果、毒性変化には主にROSの生成が寄与していることを明らかにした。

上記の試験で得られた毒性値または影響を及ぼす濃度と既報の環境水中濃度を比較し、NPAHsの初期リスク評価を行った。その結果、環境水中濃度が実測または推定されている5種のNPAHsのうち、4種については光による毒性変化や魚類に対する慢性毒性値の不確実性を考慮しても、現在の海水中濃度で海産生物に影響を及ぼす可能性は低いと想定されるが、1-ニトロピレンについては海産生物、主に藻類に影響を及ぼす可能性があることを明らかにした。本研究で得られた研究成果はこれまでほとんど研究例のないNPAHsの海洋生態系に対する環境影響評価に繋がるものであり、主に沿岸域の海洋環境の保全に有益な情報となることが期待される。