

化審法で新しく導入された分解度試験の条件検討

住友化学株式会社

生物環境科学研究所

竹 腰 沙 紀

高 野 光 太 郎

的 場 好 英

棕 本 麻 記 子

大阪市立大学

立 花 亮



はじめに

環境中に排出された化学物質が、分解し難く長期に残留して、生物体内に蓄積し、強い毒性を有する場合、食物連鎖を通じてヒトや生態系に重篤な影響を与えることが懸念される。このような物質の環境汚染を防止するため、日本では1973年に「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）」¹⁾が制定され、新規の化学物質を製造・輸入する前に、微生物による分解性、魚体内中への蓄積性、ヒトや動植物への毒性を段階的に評価している（Fig. 1）。この評価において、最初に行われる分解度試験で「良分解性」と判定されると、環境汚染の懸念が低いことから後続試験は不要となり、評価が終了する²⁾。この分解度試験はOECDガイドライン301C（以下、301C）³⁾に従い実施するが、この試験法では分解を受けにくい物質が他の試験法と比べて多く、また、分解を受けやすい物質であっても結果の再現性が低いことや、実環境中の分解性との乖離が指摘されていた^{4)~7)}。そこで、2018年度からはOECDガイドライン

301F（以下、301F）³⁾に従った試験法も、化審法に導入されることになった⁸⁾。本稿では、実環境中における化学物質の分解性をより精緻かつ簡便に評価できる手法の確立を目指し、301Fの試験条件について種々検討したので報告する。

化審法における分解度試験

1. 方法の概要

分解度試験にはさまざまな種類があるが、化審法に導入されている分解度試験の301Cおよび301Fは分解性評価のスクリーニング試験に位置づけられる。他の分解性評価の高次試験と比べて被験物質の濃度が高く設定されており、比較的簡便に実施できるものの、実環境中と比べると分解が進みにくい試験条件となっている。すなわち「試験で分解する物質」は「実環境中でも分解する」と明確に判断できる一方で、「試験で分解しない物質」は「実環境中でも分解せずに残留する」とは限らない。これらの試験では共に、被験物質を100 mg L⁻¹含有する試験液に活性汚泥を30 mg L⁻¹添加して28日間暴露を行う。活性汚泥中の微生物は被験物質を分解する際に酸素を消費する。この酸素消費量は生物化学的酸素要求量（Biochemical oxygen demand: BOD）と呼ばれ、特殊な装置（クーロメータ）を用いて経時的に測定される。測定したBODを、被験物質が無機化するために必要な理論上の酸素量で除することにより、BOD分解度を算出する。BOD分解度が60%以上、かつ分解物が生成しない場合、被験物質および分解物は環境中で迅速かつ完全に分解されるとして、化審法では「良分解性」と判定される⁹⁾。また、暴露28日目の試験液をHPLCなどの直接分析により測定し、被験物質の残存率が

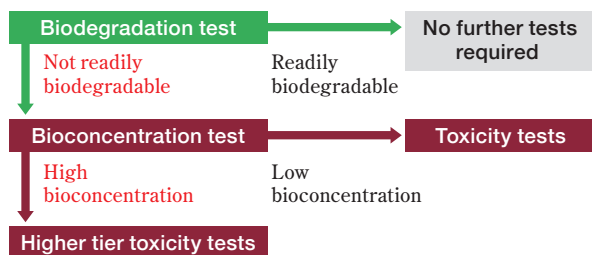


Fig. 1 Evaluation scheme of chemicals under the Japanese Chemical Substances Control Law

30%未満の場合、化審法では被験物質は環境中に長期間残留する懸念は低いとみなせることになっている^{10), 11)}。したがって、「良分解性」と判定された被験物質は、この残存率30%未満の基準を当然達成するものと考えることができる。

従来の301Cと新しく導入された301Fには以下の違いがある。①301Cでは国内の河川、湖沼、下水処理場などから採取し1カ月以上培養した活性汚泥（以下、標準活性汚泥）を試験に用いるが、301Fでは下水処理場から採取後、培養せずに使用する。②301Fでは被験物質を担体に吸着させたり乳化剤で分散させて暴露することが可能となった。③301Cでは試験液量が300 mLに規定されているが、301Fではその規定がなくなった。そこで、301Fに規定されている範囲において、適切な試験条件を検討することとした。Table 1に示したように、過去の試験結果¹²⁾⁻¹⁷⁾から「良分解性」と考えられている2,9-anthraquinone (AQ)、2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (OxB)、3,4-bis(2-ethylhexyl)phthalate (Bis) と、それぞれの基本骨格は同じで側鎖が付加された構造を有し、「非良分解性」と考えられた2-ethyl-9,10-anthraquinone (2-EA)、2-hydroxy-4-n-octyloxybenzophenone (OB)、tris(2-ethylhexyl)trimellitate (Tris) を用い、暴露してから28日目の被験物質をHPLCにて定量し、分解性を評価した。

2. 結果の概要

(1) 活性汚泥の違いによる分解性の比較

標準活性汚泥を使用する301Cと、採取直後の下水処理場汚泥を使用する301Fについて、暴露28日目における被験物質の残存率を比較した (Fig. 2)。その結果、301CにおいてAQ、OxB、Bisはいずれも80%以上残存し、分解がほとんど確認されなかった。これらの被験物質は過去の301Cを含む試験結果から「良分解性」と考えられているため、本来であれば残存率が30%未満となるはずであるが、今回の結果から301Cの再現性は低いことが改めて確認できた。一方、301Fでは被験物質の分解がより進み、301Cよりも分解性が向上したことから1カ月以上の培養により標準

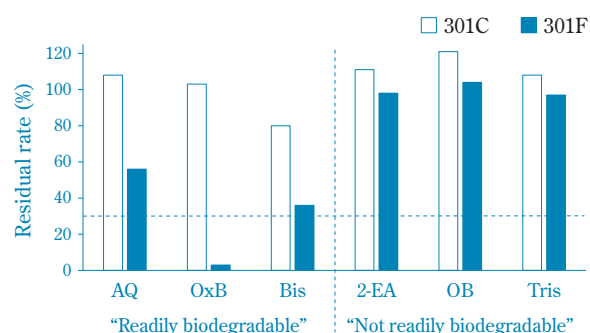
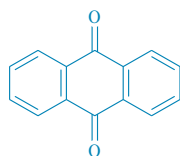


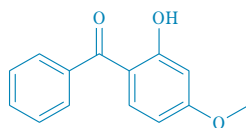
Fig. 2 Comparison of residual rates at 28 days between OECD 301C and 301F tests

Table 1 Test chemicals

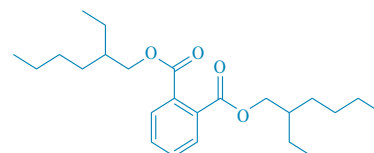
Judged to be “readily biodegradable” in previous studies



2,9-Anthraquinone (AQ)

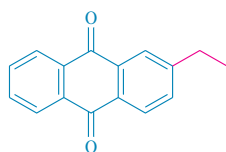


2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (OxB)

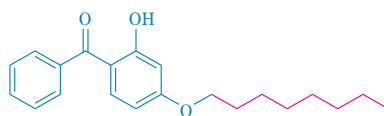


3,4-Bis(2-ethylhexyl)phthalate (Bis)

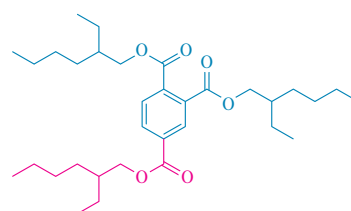
Judged to be “not readily biodegradable” in previous studies



2-Ethyl-9,10-anthraquinone (2-EA)



2-Hydroxy-4-n-octyloxybenzophenone (OB)



Tris(2-ethylhexyl)trimellitate (Tris)

化された標準活性汚泥よりも、採取直後の下水処理場汚泥の方が高い分解活性を有していることが示された。なお、過去の結果から「非良分解性」と考えられている2-EA、OB、Trisについては、301Cだけでなく301Fでもほとんど分解が見られず、汚泥を変更することによる分解性の差は認められなかった¹⁸⁾。

(2) 担体や乳化剤の添加による分解性の違い

従来の301Cでは被験物質の濃度が100 mg L⁻¹と規定されているため、難水溶性物質の場合は不溶状態でも試験を行っていた。301Fでは担体や乳化剤を試験液に添加することができるようになったため、それらの種類と添加量を検討することとした。検討の結果、担体の種類は薄層クロマトグラフィー用シリカゲル（粒子径15 μm）とし、担体に被験物質を吸着させて、担体および被験物質の濃度がそれぞれ1300および100 mg L⁻¹となるよう試験液に添加したとき、大幅に分解性が向上した（Fig. 3）。具体的には、「良分解性」物質と考えられたAQ、OxB、Bisだけではなく、「非良分解性」物質と考えられた2-EAおよびOBも28日目の残存率が30%未満となり、これらの被験物質は環境中に長期間残留する懸念が低いことが示唆された。シリカゲルに被験物質を吸着させることで微生物との接触機会が増大し、分解性が向上したと考えられる。

乳化剤についても検討した結果、抗菌活性の低い非イオン性の界面活性剤Tween 80を40 mg L⁻¹の濃度となるよう試験液に添加すると、分解性の向上が認められた。具体的には、「非良分解性」物質と考えら

れた2-EAおよびOBの28日目の残存率は、34%および24%にまで減少した。実環境中における化学物質は当該試験系よりも濃度が低い場合が多く、有機物や無機物に吸着し分散して存在している。適切な担体や乳化剤を適量添加することで実環境中の分解条件を反映させ、301Cでは「非良分解性」と考えられていた化学物質でも、実環境では長期に残留する懸念が低いことが示唆された¹⁸⁾。

(3) 試験液増量による分解性の違い

環境中には、多種の微生物が存在している。微生物種の偏りをなくすためには、使用する微生物の絶対量（試験液量）を多くすることが望ましい。301Cでは試験液量が300 mLに規定されているため、実環境中に存在する一部の微生物しか試験容器に添加することができなかったが、301Fではその規定がなくなった。Martinの研究¹⁹⁾によると、分解度試験において被験物質である4-nitrophenolと活性汚泥の濃度は一定のまま、試験液量のみを10、50、100、500、1000 mLと変化させた場合、試験液を増量するにつれて被験物質の分解が促進し、500 mLで頭打ちになることが示されている。そこで、本研究では301Fにおける試験液増量の効果を確認することにした。化審法下での301Fで使用するクーロメータに格納できる培養瓶のサイズを検討したところ、試験液は3900 mLまで増量可能であったため、当該検用に培養瓶を特別に設計し製造して検討を行った（Fig. 4）。

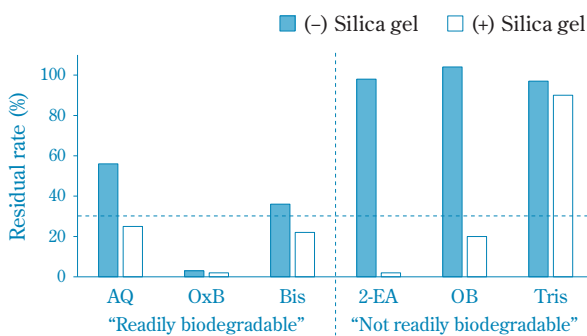


Fig. 3 Residual rates at 28 days in OECD 301F tests without (-) and with (+) silica gel



Fig. 4 Coulometer with test vessels that contain 300, 900 and 3900 mL of test media

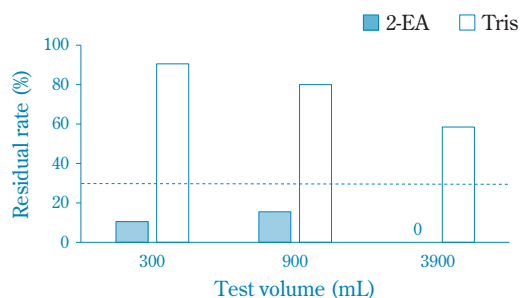


Fig. 5 Residual rates at 28 days in OECD 301F tests with silica gel for test media of 300, 900 and 3900 mL

被験物質である2-EAまたはTrisをシリカゲルに吸着させ、被験物質、シリカゲル、活性汚泥の濃度は同じ条件で、試験液量のみを300、900および3900 mLと変化させ301Fを実施した。28日目の残存率から、2-EAおよびTrisともに、試験液の増量により分解が促進する傾向が示された (Fig. 5)¹⁸⁾。活性汚泥中の微生物は凝集体を形成し不均一な状態で存在しているため²⁰⁾、少量の活性汚泥の添加では一部の微生物による活性しか発揮できず、汚泥量が多いほど本来有する分解活性に近づくことが推察された。例えばTrisの分解には、分岐アルキル鎖とベンゼン環を分解する微生物の存在が不可欠であり、多くの汚泥を添加することで、多種類の微生物が試験液に添加されることになり、分解する確率が上昇したと考察される。実環境中では、分解度試験の試験条件よりもはるかに多くの微生物種が存在すると考えられることから、試験液の増量は実環境中における化学物質の分解性を評価するのに有効な手法と考えられた。

おわりに

本研究では化審法で新たに導入された分解度試験301Fについて、被験物質の分解活性の観点から検討を行った。その結果、①従来から301Cで使用している、1か月以上培養した標準活性汚泥よりも、新たに導入された301Fで使用する採取直後の下水処理場の汚泥の方が高い分解活性を有すること、②301Fでは担体あるいは乳化剤を添加することが可能であり、担体として粒子径15 μmのシリカゲルを、乳化剤としてTween 80を適量添加することで被験物質の分解性が向上すること、③301Fでは試験液量の規定がなく

なったため、被験物質、シリカゲル、活性汚泥の濃度は変化させずに試験液を増量するだけで、被験物質の分解が促進することが分かった。以上のように新手法である301Fを導入することにより、実環境中での化学物質の分解性をより精緻かつ簡便に反映させることが可能となったと考えている。今後もさらなる担体や乳化剤および試験液増量の方法を検討し、実環境中における化学物質の分解性をさらに効率的に評価する試験系を構築していきたい。

引用文献

- 1) “化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律” (1973).
- 2) (一財)化学物質評価研究機構, “化審法における試験の流れ”, https://www.cerij.or.jp/service/10_risk_evaluation/chemical_substances_control_law_01.html (参照2021/2/26).
- 3) OECD, “OECD Guideline for Testing of Chemicals, Test No. 301: Ready Biodegradability” (1992).
- 4) A. Kowalczyk *et al.*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 111, 9 (2015).
- 5) A. Ott *et al.*, *Sci. Total Environ.* 666, 399 (2019).
- 6) T. J. Martin *et al.*, *Environ. Sci. Technol.* 51, 3065 (2017).
- 7) T. J. Martin *et al.*, *Environ. Sci. Technol.* 51, 7236 (2017).
- 8) 化審法ガイドライン, “微生物等による化学物質の分解度試験” (2018), <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/0000188296.pdf> (参照2021/4/19).
- 9) 厚生労働省, 経済産業省, 環境省, “指定化学物質への該当性の判定等に係る試験方法及び判定基準”, <https://www.nite.go.jp/data/000009350.pdf> (参照2021/3/18).
- 10) 厚生労働省, 経済産業省, 環境省, “新規化学物質の分解度試験で残留した親物質及び変化物の取扱いの合理化について (お知らせ)”, https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/todoke/shinki/170725_bunkai.pdf (参照2021/2/18).
- 11) (一財)化学物質評価研究機構, “平成28年度経済産業省委託事業化学物質安全対策 (分解度試験において残留した変化物に関する調査・検討) 報告書”,

- https://www.meti.go.jp/meti_lib/report/H28FY/000057.pdf (参照2021/2/26).
- 12) 化審法データベース (CAS RN 84-65-1), https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/template.action?ano=16912&mno=4-0686&cno=84-65-1&request_locale=ja (参照2021/2/26).
- 13) ECHA, registration dossier (CAS RN 131-57-7), <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/5515/5/3/2/> (参照2021/2/26).
- 14) 化審法データベース (CAS RN 117-81-7), https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/template.action?ano=3800&mno=3-1307&cno=117-81-7&request_locale=ja (参照2021/2/26).
- 15) 化審法データベース (CAS RN 84-51-5), https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/template.action?ano=997&mno=4-0687&cno=84-51-5&request_locale=ja (参照2021/2/26).
- 16) 化審法データベース (CAS RN 1843-05-6), https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/template.action?ano=6414&mno=4-0141&cno=1843-05-6&request_locale=ja (参照2021/2/26).
- 17) 化審法データベース (CAS RN 3319-31-1), https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/template.action?ano=6902&mno=3-1372&cno=3319-31-1&request_locale=ja (参照2021/2/26).
- 18) S. Takekoshi *et al.*, *J. Pestic. Sci.*, 46(2), 143 (2021).
- 19) T. J. Martin, "The influence of microbial inocula on biodegradation outcome towards enhanced regulatory assessments", Newcastle University (2014).
- 20) F. V. O. Kloeke and G. G. Geesey, *Microb. Ecol.*, 38, 201 (1999).