

石油及び油処理剤の魚類に対する影響評価

独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所

化学環境部 生物影響研究室 角埜 彰

1 はじめに

1997年1月の日本海におけるナホトカ号油流出事故、同年7月の東京湾におけるダイヤモンドグレース号油流出事故等、日本近海で大規模な石油流出事故が過去に発生しました。現在でも、我が国沿岸には多くのタンカーが航行しており、大規模な石油流出事故発生の危険性が指摘されています。

ナホトカ号の重油を用いた研究では、ヒラメ卵でごく低濃度の油分でも死亡、孵化率低下などの影響が認められました。このことから、魚類などの初期発育段階に対する影響を中心として、流出油の生物に対する有害性の解明が求められました。また、ナホトカ号事故では流出油の多くが海岸に漂着したため、沖合域での処理剤散布の必要性が改めて認識されました。さらに、ダイヤモンドグレース号事故では内湾の海岸域で大量の油処理剤が散布され、油処理剤の海産生物に対する有害性が懸念されました。これらの油流出事故をきっかけに、環境省のプロジェクト研究「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」が、独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所化学環境部で2001年から2005年までの5年間にわたり実施されました。ここでは、その成

果の中から、油や油処理剤の毒性、油の毒性予測について紹介します。

2 研究方法

一般的に、石油類は、ガソリン>A重油>軽油>灯油>B重油>原油>C重油、の順に毒性が強いと言われています。この毒性の強さは、これらの油に含まれている成分によって異なっています。油に含まれる種々の成分の中で、特に毒性が強いことが知られている物質が、多環芳香族炭化水素化合物です。多環芳香族炭化水素化合物はPAHと略して呼ばれ、図1の防虫剤としても使用されているナフタレンのように、亀の甲羅のような形が2つ以上連なった構造をしています。我々は、このPAHに着目して、種々のPAHの毒性とPAHの物性との関係を調べ、次に種々のPAHを組み合わせて複合的に作用させたときの毒性を調べました。また、石油については、A重油単独の毒性とA重油と油処理剤を混ぜた場合の毒性を比較しA重油に含まれるPAHの種類と量からA重油の毒性を推測しました。

2.1 試験物質

試験に用いたPAHは、ナフタレン(以下NAPと略記)、

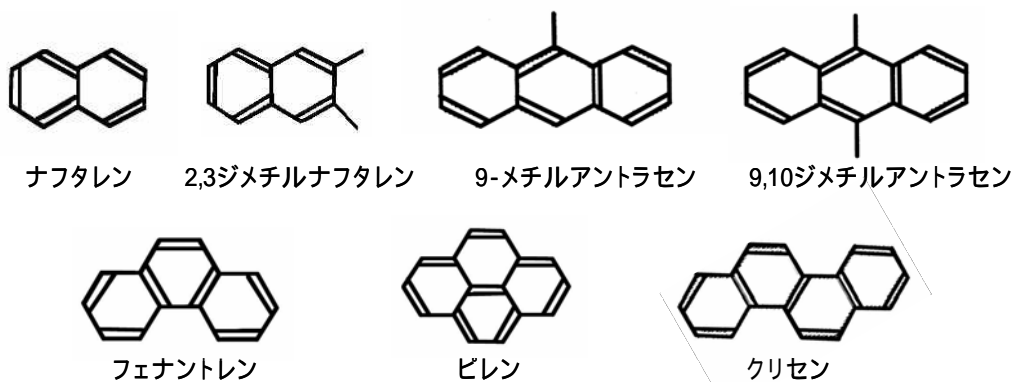


図1 試験に用いたPAHの構造式

表1. 試験に供したPAH

CAS. No.	物質名	化学式	分子量	水溶解度 (mg/L 25)	log Kow
91-20-3	naphthalene(ナフタレン)	C10H8	128.17	31.7 ¹⁾	3.4 ¹⁾
581-40-8	2,3-dimethylnaphthalene(2,3-ジメチルナフタレン)	C12H12	156.23	3.0 ²⁾	4.4 ²⁾
779-02-2	9-methylanthracene(9-メチルアントラセン)	C15H12	192.26		5.07 ³⁾
781-43-1	9,10-dimethylanthracene(9,10ジメチルアントラセン)	C16H14	206.29		5.69 ³⁾
85-01-8	phenanthrene(フェナントレン)	C14H10	178.23	1.29 ¹⁾	4.6 ¹⁾
129-00-0	pyrene(ピレン)	C16H10	202.26	0.135 ¹⁾	5.18 ¹⁾
218-01-9	chrysene(クリセン)	C18H12	228.29	0.002 ¹⁾	5.91 ¹⁾



図2 マミチヨグの胚(左下), ふ化仔魚(左上), マミチヨグ雌成魚(右下)及び雄成魚(右上)

2,3-ジメチルナフタレン, 9-メチルアントラセン, 9,10-ジメチルアントラセン, フェナントレン(PHE), ピレン(PYN)及びクリセン(CHR)の7種類です。PAHの構造式は図1に, 性状¹⁻⁴⁾を表1に示しました。また, 石油及び油処理剤の毒性を調べるため A重油及びダイヤモンドグレース号油流出事故の際に使用された油処理剤の中で毒性が弱いネオスAB3000(株式会社ネオス)を試験に用いました。

2.2 試験生物

試験魚には, 発生, 生殖等の広い分野で研究に用いられている海産メダカの仲間であるアメリカ東海岸原産のマミチヨグ(*Fundulus heteroclitus*)のふ化仔魚を用いました(図2)。

2.3 試験方法

2.3.1 PAH単独曝露による急性毒性試験

急性毒性試験は, 海産生物毒性試験指針の急性毒性試験法⁵⁾及びOECDテストガイドライン203魚類急性毒性試験法⁶⁾に準じて図3に示す装置を用いて流水式で実施しました。マミチヨグふ化仔魚は濃度区ごとに用意した容量30Lのガラス水槽でフロートにより浮かせ

た観賞魚ネットに10尾ずつ収容して無給餌で試験を行いました。各PAHをアセトン及び医薬用硬化ひまし油HCO-40に溶解した試験原液を作製し, これを水道水に加えて良く攪拌して作製した試験液をガラス製微量定量ポンプにより各試験水槽に添加し続けるとともに海水も一定の割合で注入して所定の濃度を保ちながら96時間の曝露試験を行いました。また, アセトン及びHCO-40のみを添加した助剤対照区と, 無添加対照区も設けました。実験開始時及び試験終了時の96時間目にPAHの水中濃度を測定しました。96時間半数致死濃度(96hrLC50)は, 実測PAH濃度の平均値及び各濃度区の死亡率からプロビット法により求めました。

2.3.2 PAH複合曝露による急性毒性試験

複合曝露試験も上記の急性毒性試験に準じて流水式にて行いました。試験濃度は, 各被検物質の96hrLC50を参考にして種々の濃度を組み合わせで決定し, 2種類, 3種類及び4種類のPAHの複合曝露試験を実施しました。試験生物としてマミチヨグふ化仔魚各10尾を用いました。また, 死亡個体及び生残個体の一部については試験終了時に取り上げて体重を測定した後, PAHの体内濃度を測定しました。



図3 流水式試験装置(右)及びネットに収容したマミチヨグふ化仔魚(左)

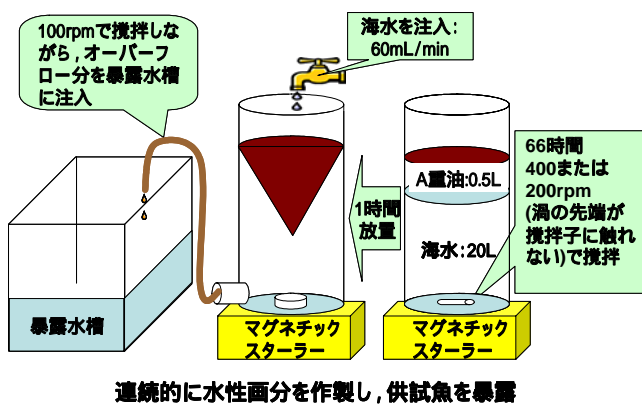


図4 A重油水性画分の毒性試験を実施した装置の概略

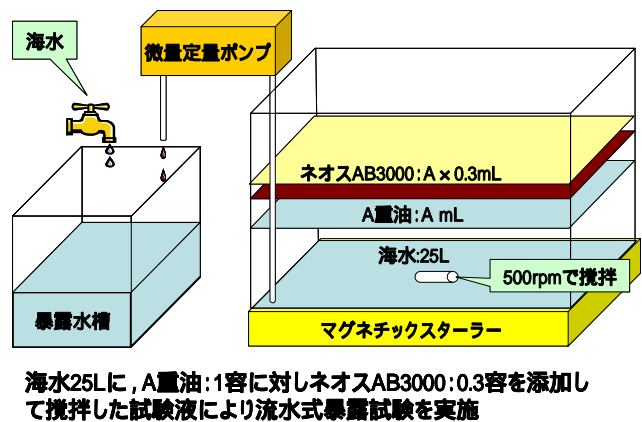


図5 ネオス AB3000 及び A 重油とネオス AB3000 混合物の毒性試験を実施した装置の概略

2.3.3 油の水性画分による急性毒性試験

A重油の水性画分の急性毒性試験は、図4に示す装置を用いて実施しました。マグネチックスターラー上に設置したガラス製広口瓶に、予め海水20L及びA重油0.5L入れて渦の先端が搅拌子に触れないように回転数を設定して、66時間搅拌を続けました。試験前に搅拌を止め、油の層と海水の層が分離し、油の粒子が浮上するまで約1時間静置しました。試験開始直前に、少量の海水を注入しながら緩やかに搅拌して水槽底部からオーバーフロー分を暴露水槽に注入し、96時間の試験を行いました。死亡個体及び試験終了時の生残は体重を測定した後、PAHの体内濃度を測定しました。各水槽のPAH濃度は、実験開始24時間後及び72時間後に測定しました。

2.3.4 油処理剤、油及び油処理剤混合物による急性毒性試験

油処理剤であるネオス AB3000,あるいはA重油及びネオス AB3000の混合物の暴露試験は、図5に示す流水式装置を用いて実施しました。まず試験に先立って、ガラス製の水槽に海水を25L入れ、これにネオス AB3000単独または、A重油を1容に対しネオス AB3000を0.3容加え、マグネチックスターラーを用いて室温条件下500rpmで66時間搅拌しました。試験開始直前に、マミチヨグふ化仔魚を暴露水槽に収容し、搅拌液をガラス製微量定量ポンプで注入するとともに海水も一定の割合で注入して試験を開始し、96時間の暴露試験を行いました。また、死亡個体及び試験終了時の生残個体は体重を測定した後、PAHの体内濃度を測定しました。各水槽のネオス AB3000濃度及びPAH濃度は、実験開始24時間後及び72時間後に測定しました。

2.4 PAH及び油処理剤の分析

各試験水中のPAH濃度は、海水試料に内部標準として

ナフタレン- d_6 ,フルオレン- d_{10} ,アントラセン- d_{10} ,ピレン- d_{10} 及びクリセン- d_{12} を添加してヘキサン抽出後,ガスクロマトグラフ質量分析装置(GC/MS)を用いて電子イオン化法(Electron Ionization, EI)で測定モードを選択イオン検出(Selective Ion monitor, SIM)として定量しました。なお,サンプル・スパイクとシリンジ・スパイクのみを添加したヘキサン・ブランクに対する測定値から計算した定量下限値は,ナフタレン 1 $\mu\text{g/L}$,フェナントレン 0.1 $\mu\text{g/L}$,ピレン 0.1 $\mu\text{g/L}$,クリセン 0.1 $\mu\text{g/L}$ でした。

また,魚体中のPAHの分析については立石の方法⁷⁾に準じて,ナフタレン,メチルナフタレン類(C1-NAP),ジメチルナフタレン類(C2-NAP),アセナフチレン(ACEL),アセナフテン(ACE),フルオレン(FLU),フェナントレン,アントラセン,メチルフェナントレン類(C1-PHE),フルオランテン(FLUT),ピレン,ベンゾ(a)アントラセン(B(a)A),クリセン,ベンゾ(b)フルオランテン(B(b)F),ベンゾ(k)フルオランテン(B(k)F),ベンゾ(a)ピレン(B(a)P),インデノ(123-cd)ピレン(INDE),ジベンゾ(ah)アントラセン(DB(ah)A),ベンゾ(ghi)ペリレン(B(ghi)P)の2から6環のPAHを定量しました。これらPAHの定量下限は,魚試料 0.1gを使用した場合,10ng/gでした。

油処理剤の濃度については,日本工業規格 JIS K 0102 の 30.2 非イオン界面活性剤⁹⁾ の手法に準じて,ネオスAB3000 を標準として,テトラチオシアノコバルト()酸吸光度法により分析しました。

2.5 複合暴露の評価法

2 物質以上の複合暴露の場合について,次式により複合毒性値(Toxic Unit ; TU)⁹⁾を算出しました。

$$TU=C1/R1+C2/R2+\dots$$

C1 : 物質 1 の実測濃度

C2 : 物質 2 の実測濃度

R1 : 物質 1 単独の 96hrLC50

R2 : 物質 2 単の 96hrLC50

ここで求めた TU を X 軸 死亡率を Y 軸にそれぞれとり,一連の各濃度区における TU と死亡率とをプロットした例を図 6 に示しました。複合影響が相加的となる場合 散布図に近似する TU - 死亡率曲線は死亡率 50% のとき TU の値が 1 となる点を通ります。死亡率 50% の TU の値が 1 よりも小さい場合は,複合暴露により毒性が単独の場合以上に強まることを表し,複数の物質

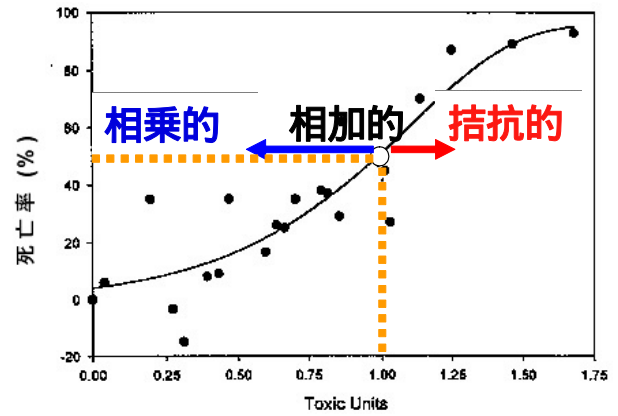


図 6 Toxic Unit による複合毒性の分類

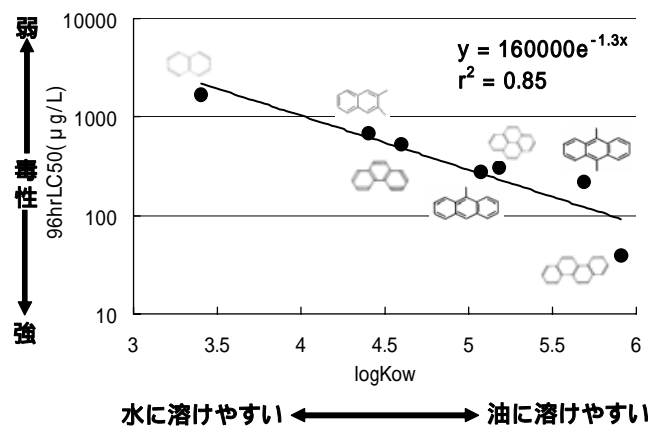


図 7 PAH の毒性と脂溶性との関係

の影響が相乗的であることを表します。死亡率 50% の TU が 1 よりも大きい場合では,複合暴露で物質各々の毒性の合計よりも毒性が弱まることを表し,複合影響が拮抗的であることを表します。

3 研究成果

3.1 PAH のマミチヨグふ化仔魚に対する急性毒性値と log Kow との関係

マミチヨグふ化仔魚を用いて各PAHに対する急性毒性値を求めた結果,メチル基が 1 個付いた 2-メチルアントラセン及び 9-メチルアントラセンは,メチル基の位置は異なりますが急性毒性値は近似していました。ナフタレンでは,メチル基の数と毒性との間の関連が明確ではありませんでしたが,アントラセンについてはメチル基が多いほど毒性が強まる傾向が認められました。また,これら毒性値と脂溶性を表す logKow との関連を図示すると図 7 のようになりました。この図から明らかなように PAH の急性毒性値と logKow との間には指数近似式が成り立ち, $r^2=0.85$ と非常に高い相関

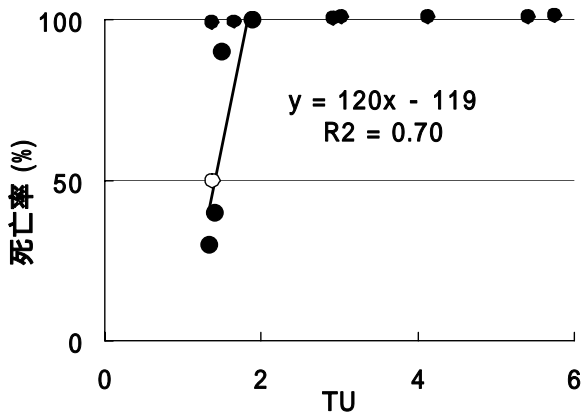


図8 ナフタレン、フェナントレンピレン及びクリセンを組み合わせた場合のTUと死亡率との関係

が認められ、logKowが大きいほど毒性が強まることが明らかとなりました。

3.2 マミチヨグふ化仔魚へのPAHの複合影響

ナフタレン、フェナントレン、ピレン、クリセンの様々な組み合わせで、TUは1から3までの値を示し極端な拮抗的あるいは相乗的影響が認められなかったこと、ナフタレン+フェナントレン+ピレン+クリセンの4種類の全てを組み合わせた場合においても図8に示すように50%の死亡を示すTUは1.45(95%信頼限界1.05-1.84)と推定されたこと等から、これらPAHの複

合毒性は相加的であろうと推察されました。

3.3 石油及び油処理剤の毒性

3.3.1 石油の水性画分の毒性

A重油単独の毒性を調べるため、流水式で水性画分の毒性試験を実施した結果、死亡率が50%を超えなかったため、PAHの総和であるPAHに基づいたLC50を求めることができませんでした。これらの水性画分の試験では、試験水槽中に若干の油膜を生じるため、採水時にこの油膜層が若干でも混ざると濃度が大きく上昇することも考えられました。このことを反映してか、水性画分の試験水の分析結果では、ナフタレンからベンゾ(ghi)ペリレンまでのPAHを検出しました(図9)。しかし、試験後に採取した生残魚について、体内のPAH濃度を分析した結果では、ナフタレンからベンゾ(a)アントラセンまでのPAHは検出可能でしたが、クリセレンより分子量の大きいPAHは検出限界(10ng/g)以下でした(図10)。

3.3.2 油処理剤及び油処理剤と石油の混合物の毒性

油処理剤単独の毒性試験の結果、ネオスAB3000のマミチヨグふ化仔魚に対する96hrLC50は290mg/Lでした。ネオスAB3000のヒメダカ(*Olyzias latipes*)に対する24時間の半数致死濃度が5000mg/Lと報告¹⁰⁾されており、マミチヨグふ化仔魚はヒメダカに比較して高い感

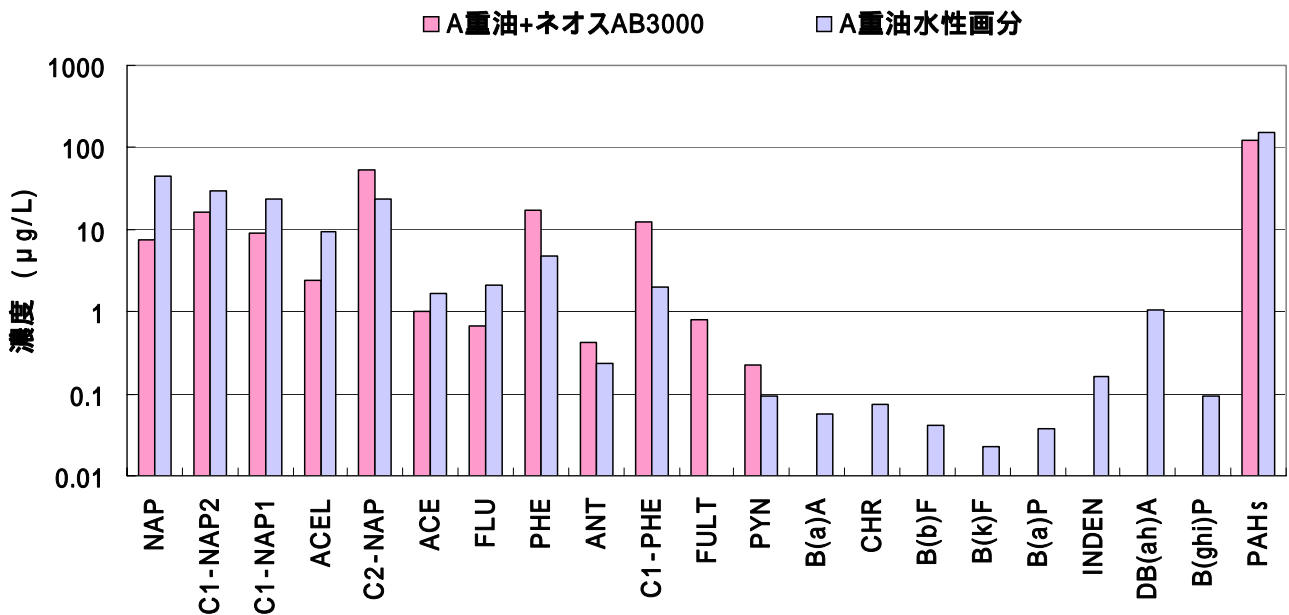


図9 A重油水性画分及びA重油+NEOSAB3000混合物の試験水中PAH濃度

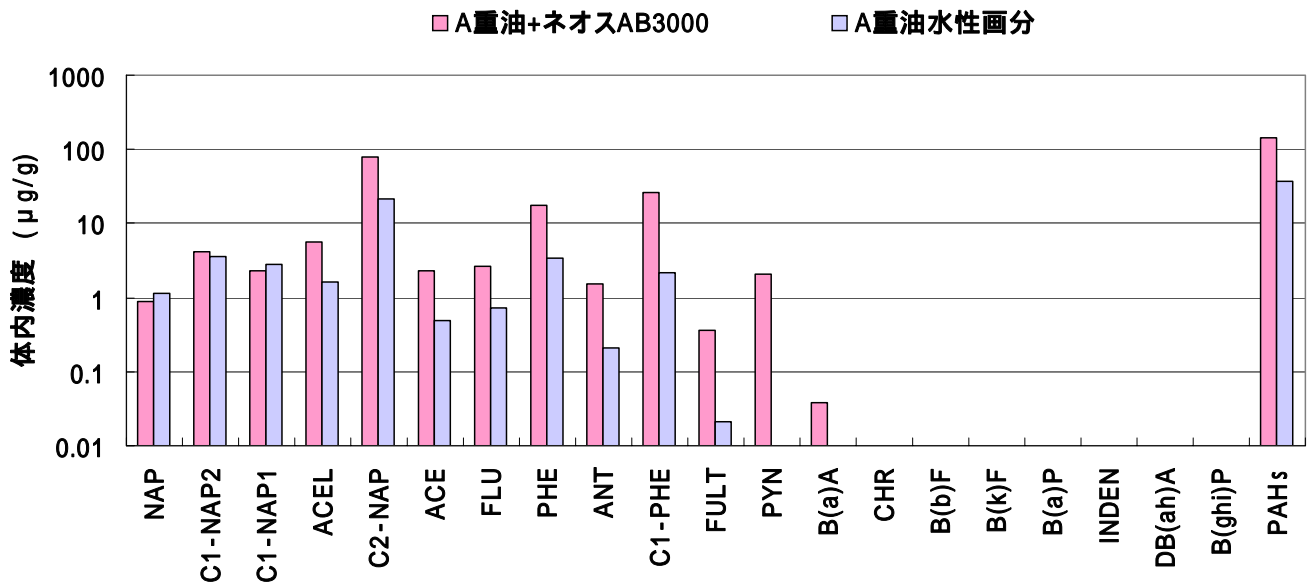


図 10 A 重油水性画分及び A 重油+NEOSAB3000 混合物に暴露した試験魚の体内 PAH 濃度

表 2. A 重油と油処理剤混合物の試験における水中濃度から推定した A 重油に含まれる各種 PAH 濃度

PAH	μg/mL
ナフタレン (NAP)	4400
メチルナフタレン (C1-NAP)	12000
アセナフチレン (ACEL)	3900
ジメチルナフタレン (C2-NAP)	28300
アセナフテン (ACE)	690
フルオレン (FLU)	640
フェナントレン (PHE)	2900
アントラセン (ANT)	270
メチルフェナントレン (C1-PHE)	3900
フルオランテン (FULT)	260
ピレン (PYN)	190
ベンゾ[a]アントラセン (B[a]A)	270
クリセン (CHR)	260
ベンゾ[b]フルオランテン (B[b]F)	290
ベンゾ[k]フルオランテン (B[k]F)	390
ベンゾ[a]ピレン (B[a]P)	110

受性を示しました。

油処理剤は、流出した油の容積の 2~3 割程度を散布するように推奨されています。そこで、A 重油を 1 容に対してネオス AB3000 を 0.3 容混合してマミチョグふ化仔魚に対する急性毒性を水中の PAH 濃度の総和 (PAH) を基に検討しました。その結果、A 重油 + ネオス AB3000 混合物の 96hrLC50 は PAH で 82 μg/L でした。また A 重油とネオス AB3000 の混合物の試験における、

96hrLC50 は A 重油の添加量で 4.2 μL/L でした。

A 重油 + ネオス AB3000 混合物の試験において 90% 以上の死亡率を示した試験区について、水中の PAH 濃度を図 9 に、このときの生残魚及び死亡魚の PAH の体内濃度についての測定結果を図 10 に示しました。この水中の PAH 濃度は、水性画分の試験と大きな差異がないにもかかわらず 90% を超える死亡率を示しました。

水中 PAH 濃度に大きな差異は認められませんでした。水性画分の試験と A 重油とネオス AB3000 の混合物の試験で死亡率が大きく異なった原因について検討するため、PAH の体内濃度について検討しました。ナフタレンからベンゾ(a)アントラセンまでの PAH については、メチルナフタレン、ジメチルナフタレン、フェナントレン、メチルフェナントレン、フルオランテン、ピレン及びベンゾ(a)アントラセンの濃度が、A 重油 + ネオス AB3000 の試験で著しく高くなっていました。また、ベンゾ(a)アントラセンは体内では検出されませんが水中の濃度が検出限界以下であったため、濃度比の算出ができませんでした。ネオス AB3000 の添加により PAH の体内濃度は A 重油だけの場合と比較して約 10 倍上昇しました。前述のように logKow が大きい PAH ほど毒性が強いことから、logKow の大きい PAH の体内濃度上昇が死亡に大きく関連したものと考えられました。

3.4 油の毒性の推測

表3. PAHのlog Kowとマミチヨグ
ふ化仔魚に対する96hrLC50
との関連から推定した毒性値

PAH	log Kow	log Kowから推定 した96hrLC50 μg/L
NAP	3.4	1656
C1-NAP	3.87	1070
ACEL	4.07	882
C2-NAP	4.36	672
ACEL	3.92	1016
FLU	4.18	796
PHE	4.6	536
ANT	4.5	589
C1-PHE	5.07	345
FLUT	5.22	300
PYN	5.18	311
B[a]A	5.61	208
CHR	5.91	39
B[b]F	5.75	39
B[k]F	6.84	39
B[a]P	6.5	39

油の毒性について、その油に含有される PAH 及びその構成比率から推定を行うため行うため、まず、A 重油について PAH の含有量の推定を行いました。A 重油とネオス AB3000 の混合物の試験では A 重油成分がネオス AB3000 により海水中に均一に分散していると考えられたので、A 重油の添加量及び水中の PAH 濃度から A 重油の PAH 含有量を推定した結果、表 2 に示す値を得ました。また、マミチヨグふ化仔魚に対する毒性値と logKow との関連が明らかになっており（図 4）、毒性値が不明な PAH について、その logKow から毒性値を推定した結果、表 3 に示す値を得ました。さらに、PAH の複合毒性はほぼ相加的であると推測されたことから、A 重油中の PAH の推定濃度（表 2）と logKow から推定した PAH の 96hrLC50（表 3）とから、A 重油の毒性比（A 重油に含まれる PAH 濃度 ÷ 96hrLC50 × 1000）を算出し、表 4 に示す値を得ました。表 4 の合計値は、A 重油 1mL を約 110000 倍に希釈しても 96 時間以内にマミチヨグの半数を死亡させる毒性を有していることを示しています。これらの値から A 重油の毒性値を推定すると、9 μL/L となりました。A 重油の 96hrLC50 が 4.2 μL/L であったことと比較すると、A 重油の毒性の半分程度は PAH の組成及び成分から推測可能であることが明らかとなりました。

このように毒性の推定値と実測値が良く一致したことから、この手法を用いて他の重油や原油についても毒性を予測することが可能と考えられます。また、

表4. A重油に含まれるPAHの毒性比
PAH濃度 ÷ 推定96hrLC50 × 1000

PAH	毒性比
NAP	2658
C1-NAP	11215
ACEL	4420
C2-NAP	42113
ACEL	679
FLU	804
PHE	5407
ANT	458
C1-PHE	11306
FLUT	868
PYN	611
B[a]A	1300
CHR	6667
B[b]F	7436
B[k]F	10000
B[a]P	2821
合計	108761

油処理剤の使用により、魚体中の PAH 濃度が上昇して油の毒性が増強することから、海水交換の少ない内湾域ではその使用は控え必要があることが明らかとなりました。

参考文献

- 1) WHO (1998) environmental health criteria 2002: selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons (online), available from <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc202.htm>>.
- 2) 化学物質データベース <<http://w-chemdb.nies.go.jp/kis-plus/search.asp>>, Data From SRC PhysProp Database(online)
- 3) Chem Finder <<http://chemfinder.cambridgesoft.com/>>(online)
- 4) C. Hansch, A. Leo, and D. Hoekman (1995) Exploring QSAR, hydrophobic, electronic, and steric constants (S. R. Heller ed.), American chemical society, Washington, DC, p348.
- 5) 小山次朗 (2000) 急性毒性試験「海産生物毒性試験指針」, 水産庁, pp1-11.
- 6) 通商産業省基礎産業局化学品安全課監修 (1985) 203 魚類急性毒性試験「OECD 化学品テストガイドラインデータ解釈指針」. 化学品検査協会編集, 第一法規出版株式会社, 東京, pp857-874, 1984.
- 7) 立石晶浩(2000): 油分及び流出油成分の分析法 - 高沸点成分(n-アルカン, 多環芳香族炭化水素類 (PAH), 有機硫黄化合物), 瀬戸内海区水産研究所

調査研究叢書, 1号(流出油の海洋生態系に及ぼす影響評価法), 69-76 .

- 8) 財団法人 日本規格協会 (1993) 30.2 非イオン界面活性剤. 「日本工業規格 工場排水試験法」財団法人日本規格協会, 東京, p83-86 .
- 9) Lenwood, W. H. Jr., J. M. Gidding, K. R. Aolomon, and R. Balcomb. 1999. An ecological risk assessment for the use of Irgarol 1051 as an algaecide for antifoulant paints. *Crit. Rev. Toxicol.* 29(4), 367-437.
- 10) 株式会社ネオス 中央研究所 (2004) ネオス AB3000 の成分及び特徴, p1-5 .