

D-4 ペルシャ湾岸の原油汚染等が海洋環境に及ぼす影響の評価に関する研究

(2)原油水溶性画分が海洋生態系の構成生物に及ぼす毒性の評価に関する研究

研究代表者 中央水産研究所 黒島 良介

水産庁 中央水産研究所 環境保全部 生物検定研究室 黒島 良介

水産庁 養殖研究所 環境管理部 環境動態研究室 杉山 元彦（平成3年度のみ）

平成3年度－5年度合計予算額 13,166千円

（平成5年度予算額 3,130千円）

[要旨]

原油水溶性画分の魚類などに対する毒性影響は生理・生化学、形態異常、病理組織、習性・行動などの多岐にわたり及ぼされることが知られている。原油水溶性画分中の大部分の成分は比較的容易に蒸散により水中から消失するが、一過性の強いインパクトがその後の生物に及ぼす影響についてはほとんど明らかにされていない。また、原油水溶性画分にはジベンゾチオフェンのように毒性が強く、長く水中に残留する傾向を示す成分が含まれる。したがって、原油流出事故が海洋生物に及ぼす影響は原油流出そのものが止まった後も長期的に続く恐れがあり、各生物種に対する毒性影響の比較検討を含め、原油流出事故に対する対応策を確立するための基礎的研究を進めていく必要がある。

本研究ではまずはじめに、クウェート原油水溶性画分の主要成分の消長を明らかにし、ナフタレン類などの多環芳香族化合物はその毒性、残留性の点から特に注意を要する物質であること及び抽出直後のクウェート原油水溶性画分は海産魚類や甲殻類に対して非常に強い毒性を発揮することを示した。次に、マダイとクルマエビに対するベンゼン、トルエン、及びナフタレンの24時間半数致死濃度を明らかにし、これらの成分は海産生物に対して非常に強い急性毒性を持つことを示した。しかし、これらの低沸点成分は原油除去後比較的速やかに海水中から消滅するが、ジベンゾチオフェンなどの高沸点有機硫黄化合物は原油除去後も長期間残留することを明らかにした。さらに、ジベンゾチオフェンのマダイ及びクルマエビに対する急性毒性値を調べた結果、これらの値は既報の淡水ヒメダカに対する値より著しく低いことが分かった。また、海水中に溶存するジベンゾチオフェンはマダイやクルマエビの体内に蓄積・濃縮されることを明らかにした。これらの結果から原油流出事故後長期間にわたり、ジベンゾチオフェンなどの高沸点有機硫黄化合物による海洋生物への影響が懸念されることを指摘した。

[キーワード] 原油水溶性画分、海産生物、低沸点成分、高沸点有機硫黄化合物、残留

1. 序

現在、世界の工業などのめざましい発展を支えるために、そのエネルギー源あるいは原材料として膨大な量の原油が産出され、そのほとんどが海上を輸送されている。このため、天災あるいは人災により海洋に大量の原油が流出し、生態系への影響が懸念される事態が頻発している。19

91年にペルシャ湾において勃発した原油流出事故は大規模なものであり、海洋生態系への影響は長期にわたり及ぼされることが予想される。原油成分が生体に対して様々な毒性を発現させることは以前から知られているが、これらの成分の蓄積性や毒性発現に関しては全容が解明されているとは言い難い。

したがって、海産魚類及び甲殻類などに対する原油水溶性画分の毒性や蓄積性を評価する基礎的な研究を推進し、原油流出が海洋生態系の構成生物に及ぼす影響を的確に把握することが必要である。本研究で得られた成果はペルシャ湾における漁業資源の被害算定と資源回復予測のための基礎資料となるとともに、今後の原油流出事故に対する対応策の基礎ともなると考えられる。

2. 研究目的

(1)原油は水に比較的溶けやすいものから難溶性のものまで様々な成分を含み、その成分組成はそれぞれの生産地により特有のものである。したがって、原油の毒性評価を行うにあたり、試験溶液の調製は結果を大きく左右することが考えられる。そこで、クウェート原油から調製した試料について主要成分の分析を行い、それらの消長の特性について明らかにするとともに、海産魚類及び甲殻類に対するクウェート原油水溶性画分の毒性を評価するための予備試験を行う。

(2)原油中には様々な種類の炭化水素、硫黄化合物、酸素化合物などが含まれており、これらの成分は大きく低沸点化合物と高沸点化合物に分けられる。海洋に大量の原油が流出した際、海洋生物に及ぼす影響として低沸点化合物は大気中に揮散しやすいが毒性が高いため急性毒性が問題となり、高沸点化合物は海水中に残留しやすいので生物濃縮及び慢性毒性に関与すると考えられる。そこで、急性毒性に関与する物質として芳香族炭化水素類のマダイ及びクルマエビに対する急性毒性値を求めるとともに、生物濃縮が問題となる物質としてクウェート原油水溶性画分中の硫黄化合物を分析する。

(3)海水中に移行した高沸点有機硫黄化合物は、残留性が高いため、本化合物の1種であるジベンゾチオフェンのマダイ及びクルマエビに対する急性毒性値と蓄積性を明らかにする。

3. 研究方法

(1)－①原油水溶性画分の測定

コスモ石油松山支所から譲り受けたクウェート産原油を実験に用いた。原油水溶性画分の抽出は活性炭濾過した海水（塩分：32%）4.5lに対し、原油0.5lを5lガラス製ビーカーに計り取り、室温（23℃）でマグネチックスターラーを用いて攪拌することにより行なった。攪拌中はビーカーの上部をアルミ箔で覆い、さらにビーカー全体をポリエチレンの袋に密閉した。スターラーによる攪拌速度は原油のパーティクルが海水層に分散しない程度に設定した。また、原油水溶性画分の消失は上層の原油をすべて取り除きビーカーをポリエチレン袋から取り出した状態で攪拌を続けることにより調べた。海水試料の採取は攪拌を休止し、暫く静置した後に行なった。海水の蛍光測定は日立：MPF-2Aモデルを用い、直接行なった。ナフタレン画分は励起波長：230nm、蛍光波長：335nm、フェノール画分は励起波長：265nm、蛍光波長：300nmで測定した。

(1)－②原油水溶性画分の主要成分分析

前述の方法により、試料1：24時間攪拌、試料2：24時間攪拌後原油を除去し、さらに24時間攪拌、試料3：240時間攪拌した海水試料について分析を行なった。低沸点化合物分析用に海水10mlを20ml容バイアル瓶に計りとり、内容を窒素で置換した後密栓し、80℃に設定した恒温槽に1時間放置した後、ヘッドスペースガスをガスクロマトグラフ（GC）およびガスクロマトグラフ－質量

分析計 (GC-MS) で分析した。また、高沸点化合物分析用に海水100mlを分液ろうとに計りとり、n-ヘキサン10mlで振とう抽出し、脱水、濃縮後GCおよびGC-MSで分析した。

(1)-③原油水溶性画分の毒性試験 (予備試験)

海水4.5lに対し原油0.5lを添加し、24時間攪拌した後、原油層を取り除いた直後の海水と原油層を取り除き、さらに24時間攪拌を続けた海水について予備的な毒性試験を行なった。5lビーカー内の4lの海水試料に対してメジナ *Girella punctata* Gray (体重: 0.27-0.73g) またはスジェビモドキ *Leander serrifer* Stimpson (体重: 0.24-0.54g) を10尾ずつ収容し、経時的に生残率を調べた。水温は21°C、エアレーションは行なわず、試験期間中、生物に飼料は投与しなかった。

(2)-①原油水溶性画分の主要成分の急性毒性試験

各物質の急性毒性試験は止水式で行った。試験水槽はガラス製5l丸型容器を用い、1水槽にマダイ *Pagrus major* (B.W., 0.19-1.08 g) 10尾、クルマエビ *Penaeus japonicus* (B.W., 0.06-0.35) 6尾を収容し、上部をガラス板で蓋をした。試験液は24時間交換しなかった。各試験物質の濃度は24時間後に平均ベンゼン: 84.3%、トルエン: 41.8%、ナフタレン: 41.1%に低下した。試験期間中エアレーションは行なわず、生物に飼料は投与しなかった。海水のpH、D.O.、及び塩分はそれぞれ、7.1-7.7、2.5-7.1 mg/l、34%であった。

(2)-②クウェート原油水溶性画分の有機硫黄化合物の分析

前述の方法により、試料1: 240時間攪拌、試料2: 240時間攪拌後原油を除去し、さらに240時間攪拌、試料3: 480時間攪拌した海水試料について分析を行なった。分析は化学品検査協会に委託した。低沸点化合物分析用に海水10mlを20ml容バイアル瓶に計りとり、内容を窒素で置換した後密栓し、80°Cに設定した恒温槽に1時間放置した後、ヘッドスペースガスを原子発光検出器付きガスクロマトグラフ (GC/AED) 及びガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) で分析した。また、高沸点化合物分析用に海水500mlを分液ろうとに計りとり、n-ヘキサン50mlで2回振とう抽出し、脱水、濃縮後GC/AED及びGC-MSで分析した。

低沸点成分及び高沸点成分の定性分析は、GC/AEDのSチャンネル (測定波長: 181 nm) で試料のGC/AEDのクロマトグラム中に検出されたピークのリテンションタイムとジメチルジスルフィド (DMDS) 及びジベンゾチオフェン (DBT) のリテンションタイムとを比較した。いずれの試料についてもGC/MSによる分析を行った。

低沸点成分の定量分析は、GC/AEDのSチャンネルでDMDSを標準としてSチャンネルのトータルピーク面積により定量し、結果は海水中硫黄濃度で示した。高沸点成分の定量分析は、GC/AEDのSチャンネルでDBTを標準としてSチャンネルのトータルピーク面積により定量し、結果は海水中硫黄濃度で示した。

(3)-①ジベンゾチオフェンの急性毒性試験

試験に供したマダイ *Pagrus major* (B.W., 0.13-0.51 g) は神奈川県栽培漁業協会より、クルマエビ *Penaeus japonicus* は温水養魚開発協会より入手した。これらの試験生物は中央水産研究所横須賀庁舎へ搬入後、配合飼料を投与して順化したものを用いた。

試験薬剤は和光純薬工業 (株) 製の硫化ジフェニレン (ジベンゾチオフェン) 特級を用いた。この薬剤の所定量を10mlのジメチルスルホキシドに溶解し、10lの海水に分散した。

急性毒性試験はDoudoroff et al.の方法に準じて行った。まず予備試験により、96時間までの半数致死濃度が求められる濃度範囲を明らかにし、この試験に基づいて本試験を実施した。試験

設定濃度はマダイの場合、0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/lとし、クルマエビの場合、0, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55 mg/lとした。ガラス製水槽に海水を10l入れ、恒温水槽中に設置した。試験魚は各水槽に10尾ずつ収容した。試験期間中は常時通気し、試験液の交換は行わなかった。試験水温はマダイ22.5℃、クルマエビ23.5℃で海水の塩分は約34%であった。

半数致死濃度は設定濃度値からプロビット法により求めた。

(3)-②ジベンゾチオフェンの蓄積性試験

平均体重約6gのマダイ20尾及び0.7gのクルマエビ100尾をそれぞれ60lガラス製水槽に収容し、流水式装置を用いて蓄積試験を行った。海水は活性炭で濾過し、20℃に調温したものをを用いた。飼育期間中は常時飼育水に通気を行った。海水流量はおよそ500ml/minで水槽内のジベンゾチオフェン濃度が10 μ g/lとなるように中間原液をガラス製微量定量ポンプで添加した。中間原液はマグネチックスターラーで攪拌し続けた。マダイ及びクルマエビにはそれぞれ市販の飼料を体重のおよそ1%与えた。試験開始後0, 2, 4, 6週目にサンプリングを行い、第6週目にはジベンゾチオフェンの添加を中止し、清浄海水中でさらに2及び4週間飼育したものを取り上げた。マダイは一度のサンプリングにつき3尾、クルマエビは10尾とし、それぞれをプールし、分析に供した。飼育水中のジベンゾチオフェン濃度は2週目及び4週目に採水し、定量した。

(3)-③ジベンゾチオフェンの定量分析

ジベンゾチオフェンはガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)により分析した。

ア. 標準溶液の調製：ジベンゾチオフェン約100mgを精密に量り取り、n-ヘキサンで正確に100mlとして1000 μ g/mlの標準溶液とした。この液をn-ヘキサンで順次希釈して100ng/mlの定量用標準溶液とした。

イ. 海水の前処理方法：海水10mlを試験管に量り取り、n-ヘキサン1mlで振とう抽出し、上層を脱水した後GC/MS分析試料とした。

ウ. 生物試料の前処理方法：マダイのホモジネート約10gをビーカーに量り取り、アセトニトリル100mlでホモジナイズ抽出を行い、濾紙(No.6)で吸引濾過した。残さをサイドアセトニトリル50mlでホモジナイズ抽出を行い、濾紙(No.6)で吸引濾過した。濾液を合わせn-ヘキサン100ml、蒸留水300ml及び塩化ナトリウム3gを加えて5分間振とうした。上層を脱水濾過後、ロータリーエバポレーターで乾固し、残さをn-ヘキサン5mlに溶解し、フロリジルカートリッジカラムでクリーンアップを行った。溶出液を10mlに定容後適宜希釈してGC/MS分析試料とした。

4. 実験結果

(1)原油水溶性成分の海水への溶解過程を図1に示した。フェノール画分、ナフタレン画分ともに最初の24時間で急激に海水中に溶解した。フェノール画分は最初の24時間以内にほぼ飽和状態に達しているのに対してナフタレン画分の吸光度は24時間以降も緩やかに上昇を続ける傾向を示した。原油水溶性画分の海水からの消失過程を図2に示した。フェノール画分の消失はナフタレン画分に比較して速く、10日目にはほとんど検出されなかった。ナフタレン画分の消失は緩やかな減少傾向を示すのみであった。原油水溶性画分の主要成分分析結果を表1に示した。試料1(24時間抽出)にはアルカン類ではブタン、プロパン、ペンタン類が多く、芳香族ではトルエン、ベンゼン、キシレン類、ナフタレン類等の濃度が高かった。試料3(240時間抽出)のアルカンではブタン、プロパン、ペンタン類はほとんど存在せず、C₈以上のn-パラフィン試料1よ

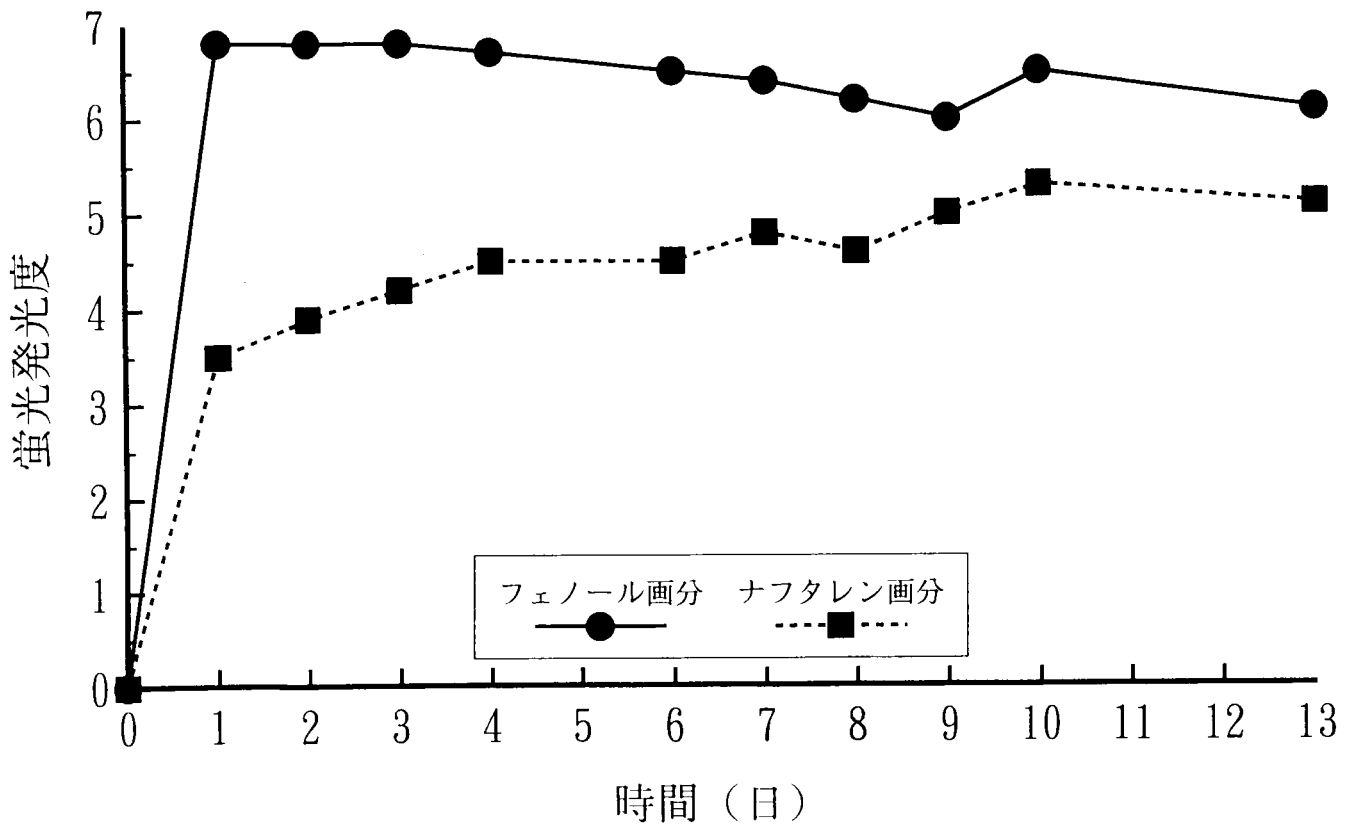


図1 原油水溶性画分の海水への溶解過程

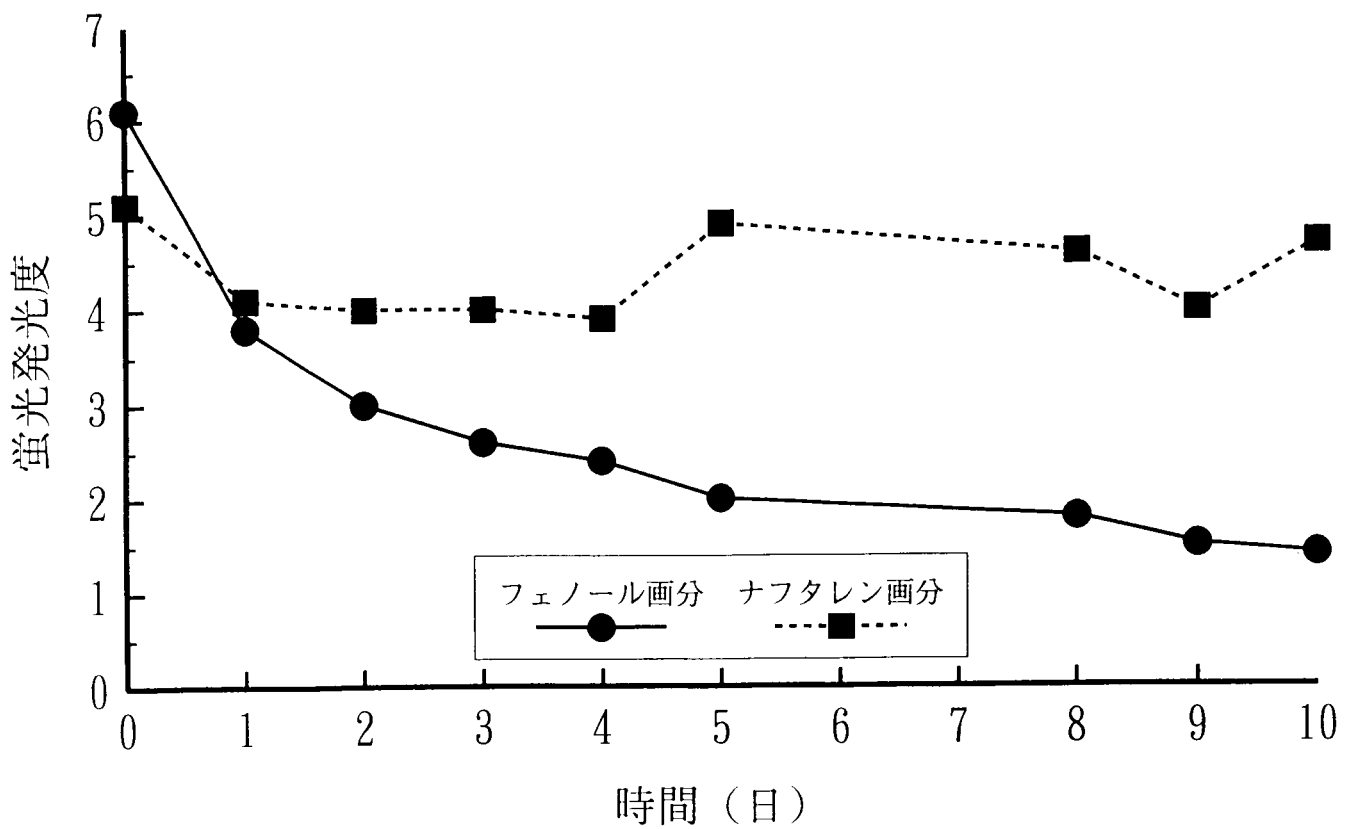


図2 原油水溶性画分の海水からの消失過程

表1 クウェート原油水溶性画分の主要成分 (mg/l)

	試料1 24時間抽出	試料2 24時間抽出 + 24時間攪拌	試料3 240時間抽出
A l k a n e s			
Ethane	0.052	0.002	0.001
Propane	0.28	0.009	N. D.
Isobutane	0.091	0.004	N. D.
Butane	0.43	0.013	0.002
Isopentane	0.18	0.008	0.004
Pentane	0.27	0.010	0.007
Cyclopentane	0.13	0.008	0.007
2-Methylpentane	0.047	0.003	0.005
n-Hexane	0.096	0.003	0.010
Methylcyclopentane	0.073	0.005	0.007
Cyclohexane	0.085	0.005	0.009
Methylcyclohexane	0.037	0.003	0.014
C ₈₋₃₄ n-paraffin	0.295	0.073	0.532
A r o m a t i c s			
Benzen	0.90	0.056	0.030
Toluene	1.1	0.060	0.34
Ethylbenzene	0.18	0.011	0.14
m, p-Xylene	0.42	0.026	0.36
o-Xylene	0.26	0.023	0.24
2-Ethyltoluene	0.11	0.004	0.12
4-Ethyltoluene	0.082	0.006	0.10
Trimethylbenzene	0.22	0.012	0.26
Tetramethylbenzene	0.12	0.018	0.14
Naphthalene	0.033	0.005	0.044
2-Methylnaphthalene	0.021	0.004	0.031
1-Methylnaphthalene	0.022	0.006	0.031
Dimethylnaphthalene	0.033	0.006	0.052
Phenanthrene	0.004	N. D.	0.007

N. D. : not detectable (<0.001 mg/l)

り濃度は高かった。また、芳香族では試料1に比べ、ベンゼン、トルエンは大きく減少したが、ナフタレン類は増加した。試料2（24時間抽出後原油を除去し、さらに24時間攪拌）では試料1に比較し、全ての成分が大きく減少していた。しかし、その減少率はアルカンではC₈以上のn-パラフィン、芳香族ではナフタレン類において他の成分に比較して小さかった。

原油層除去直後の海水に暴露されたメジナおよびスジエビモドキは全て数分以内に死亡した。原油層除去後24時間攪拌した海水に暴露した場合、メジナの生残率は暴露開始後8時間目までは100%であったが24時間目までに50%になった。その後、144時間目までに死亡する魚は無かった。スジエビモドキの生残率は8時間目までは100%であったが、24時間目までに0%になった。

(2)急性毒性試験の結果は表2に示した。マダイに対する24時間半数致死濃度はベンゼン：7.8 μl/l、トルエン：12.7 μl/l、ナフタレン：0.75 mg/l、原油：20.6%であった。また、クルマエビに対する24時間半数致死濃度はベンゼン：9.7 μl/l、トルエン：12.6 μl/l、ナフタレン：3.98 mg/l、原油：29.7%であった。すなわち、ベンゼン、トルエン、及び原油に対するマダイとクルマエビの感受性はほぼ等しいが、ナフタレンに対してはマダイの方が感受性が高かった。

有機硫黄化合物に関する分析結果は表3に示した。低沸点成分についてはいずれの試料にもジメチルジスルフィドのリテンションタイムと一致するピークは検出されなかった。各試料のSチャンネルで検出されたピークはいずれも濃度が低く、硫黄を含まない成分が多いためにGC/MSによる同定はできなかった。海水中に移行した硫黄化合物の硫黄濃度は、試料1：8.7 μg/l、試料2：検出限界以下、試料3：13.8 μg/lであった。高沸点化合物についてはいずれの試料にもGC/AEDのSチャンネルでジベンゾチオフェンのリテンションタイム付近に硫黄化合物のピークが検出されたが、分離が不十分であり、硫黄を含まない成分が多いために硫黄化合物のGC/MSによる同定はできなかった。海水中に移行した硫黄化合物の硫黄濃度は、試料1：340 μg/l、試料2：292 μg/l、試料3：209 μg/lであった。

表2 原油成分の24時間半数致死濃度

	マダイ	クルマエビ
Benzene (μl/l)	7.8 (7.1- 8.4)**	9.7 (6.5-14.2)
Toluene (μl/l)	12.7 (11.3-13.9)	12.6 (10.5-14.5)
Naphthalene (mg/l)	0.75 (0.61-0.89)	3.98 (3.7- 4.2)
Crude oil (%)*	20.6 (17.7-23.9)	29.7 (27.4-31.9)

*：0.5lの原油と4.5lの海水を24時間攪拌して得た試験原水を100%とする。

**：95%信頼限界値。

表3 クウェート原油水溶性画分の硫黄濃度(μg/l)

試料No.	低沸点成分	高沸点成分
1	8.7	340
2	N.D.	292
3	13.8	209

試料No. 1：240時間攪拌

試料No. 2：240時間攪拌後、原油を除去し、さらに240時間攪拌

試料No. 3：480時間攪拌

N.D.：検出限界(0.1μg/l)以下

(3)ジベンゾチオフェンの急性毒性試験の結果は表4に示した。マダイに対する半数致死濃度は0.39mg/l(24時間)、0.28mg/l(48時間)、0.17mg/l(72時間)、0.15mg/l(96時間)であり、クルマエビに対するそれは0.47mg/l(24-96時間)であった。

蓄積試験中の海水ジベンゾチオフェンの実測濃度は表2に示すようにマダイ約4ng/ml、クルマエビ約3.5ng/mlであった。魚体中のジベンゾチオフェン濃度は表5に示すようにマダイ、クルマエビ共に第6週目まで増加し続け、平衡に達しなかった。第6週目の濃度はマダイ3700ng/g、クルマエビ640ng/gであった。ジベンゾチオフェン添加中止後は2週間でこれらの値のおよそ10%に減少した。

表4 マダイ及びクルマエビに対するジベンゾチオフェンの半数致死濃度 (mg/l)

	マダイ	クルマエビ
24時間	0.39 (0.26-0.58)*	0.47 (0.42-0.53)
48時間	0.28 (0.20-0.36)	0.47 (0.42-0.53)
72時間	0.17 (0.03-0.26)	0.47 (0.42-0.53)
96時間	0.15 (0.04-0.22)	0.47 (0.42-0.53)

*95%信頼限界値

表5 試験海水及び魚体中のジベンゾチオフェン濃度

	マダイ	クルマエビ
海水 (ng/ml)		
2週	4.6	2.1
4週	3.4	4.9
魚体 (ng/g)		
0週	1	2
2週	970	16
4週	2400	500
6週	3700	640
6+2週	66	5
6+4週	20	4

5. 考察

(1)魚類等に対する毒性を調べるための原油水溶性画分の調製方法として、①海水と原油を混合(9:1以上)し、緩やかに(20時間以上)または激しく(5分以上)攪拌した後、海水層のみを分取する方法¹⁾、②柱状の原油層上面から海水を流入させ、下面から海水を送り出す方法²⁾、③試験生物を飼育する水槽内の海水に直接原油を添加する方法³⁾、④アセトン等の溶剤を用いる方法⁴⁾等が報告されているが、①の方法は大量に均一の試験溶液が比較的簡便に得られるという利点があるため、本研究ではこの方法にしたがった。海水中に溶出したクウェート原油水溶性画分の大部分の主成分は原油層の除去、長時間の攪拌により減少するが、n-パラフィン類およびナフタレン類は原油層存在下で長期間溶存することが分かった。ナフタレン類は魚体内に高濃度に濃縮され、毒性も強いことが報告されている⁵⁾ため、本物質についてはさらに詳しく調べる必要があると考えられる。魚類(メジナ)および甲殻類(スジエビモドキ)を用いた予備的毒性試験において死亡魚が暴露開始後24時間以内に集中すること、メジナよりスジエビモドキの方が高い感受性を示す傾向にあることが分かった。

(2)これまでに芳香族炭化水素のサケ科魚類に対する96時間半数致死濃度は、ベンゼン：1.7-14.7 $\mu\text{l/l}$ ⁶⁾、トルエン：9.36 $\mu\text{l/l}$ 、ナフタレン：3.22 mg/l ⁷⁾と報告されている。これらの結果はマダイ及びクルマエビを用いた本実験の結果とほぼ一致する。クウェート原油水溶性画分の組成分析の結果、24時間抽出でベンゼン：0.9 mg/l 、トルエン：1.1 mg/l が検出された。これらの結果は海洋への原油流出時には原油そのものが魚類の鰓等に付着し、死に到らしめる以外に、原油から海水中に移行した成分の急性毒性によっても死亡することを示唆している。

原油0.51と海水4.51を24時間攪拌して得た水溶性画分を100%とした場合、24時間半数致死濃度はマダイ：20.6%、クルマエビ：29.7%であった。この結果はサケ科魚類に対する原油の96時間半数致死濃度が2.7-4.4 mg/l ⁶⁾であることと比較すると非常に毒性が低いことを示している。この理由としては試験に用いたクウェート原油は貯蔵中に低沸点の芳香族類が揮散して毒性が減少していたことが考えられる。

したがって、海洋への原油流出時には水溶性画分中毒性の強い低沸点芳香族化合物により海洋生物はダメージを受け、これらの成分が揮散した後は残存した高沸点化合物が生体内に蓄積することが懸念される。

原油中の硫黄化合物としては、硫化水素、メルカプタン、硫化・二硫化アルキル、スルホン、スルホン酸、チオール、チオフェン類、ベンゾチオフェン類、アルキルサルフォオキサイド、チオール等の化合物が存在する。しかし、硫黄分は原油中では比較的簡単な化合物の形で存在するものは少なく、大部分は複雑な化合物の形で存在している。クウェート原油水溶性画分の硫黄化合物分析の結果はジベンゾチオフェン類等の高沸点硫黄化合物が一旦海水へ移行すると原油を除去しても大気中へ揮発せず、海水中に残留することを示した。ベンゾチオフェンやジベンゾチオフェンは生体の細胞内においてミトコンドリアの膜に作用して、その機能を傷害することが知られている⁸⁾。また、これらの有機硫黄化合物は原油に特異的に含まれる成分であり、実験的にも原油を懸濁した海水中で飼育したカキやムラサキイガイに、これらの有機硫黄化合物が移行することが証明されている⁹⁾。また、船舶の出入りの多い港におけるムラサキイガイには水中よりもはるかに高濃度のジベンゾチオフェンが蓄積している¹⁰⁾。したがってこれらの物質は海洋への原油流出後長期にわたり海中に残存し、生物体内に濃縮され、様々な障害を起こす一因となることが予想される。

(3)石油成分に対する感受性はおよそ下等な無脊椎動物から魚類に向かって増大するが、それ以上に棲息状況に関係する。カラフトイワナ(*Salvelinus malma*)、ベニザケ(*Oncorhynchus nerka*)、カラフトマス(*Oncorhynchus gorbusha*)の稚魚を用いて、淡水及び海水中のベンゼンと原油水溶性画分の毒性を比較検討した結果、3魚種とも海水に馴化した魚の方が淡水に馴化したものよりも約2倍の感受性を示すことが報告されている⁶⁾。

ジベンゾチオフェンに対する魚類の半数致死濃度の報告は少ないが、ヒメダカを用いた結果では106 mg/l (48時間)と報告されている¹¹⁾。本研究ではマダイ及びクルマエビの48時間半数致死濃度はそれぞれ0.28 mg/l 、0.47 mg/l であり、ヒメダカの100分の1以下であった。この著しい差の原因は明らかでないが、本物質がマダイやクルマエビに対して強い毒性を示すことは注目に値する。

魚類が石油で汚染された環境水、底泥、食物を通して各種の石油成分を肝臓、脳、筋肉中に蓄積することが知られている。ヒラメの一種(*Platichthys stellatus*)を1週間原油水溶性画分に暴

露するとC₄、C₅置換ベンゼンが約9000倍に濃縮されて筋肉中に蓄積する⁵⁾。また、有機硫黄化合物はムラサキイガイに濃縮率1350-3022の値で濃縮することが認められている¹²⁾。本研究において、暴露開始後6週目のジベンゾチオフェンの濃縮率は、マダイ約900倍、クルマエビ約180倍であった。しかし、これらの生物における蓄積は平衡には達しておらず、暴露時間を延長することによりさらに高い濃縮率を示すものと思われる。さらに、本物質が蓄積しやすい魚体部位などを明らかにする必要がある。魚体内に蓄積された炭化水素は清浄な環境下では速やかに排泄されるが、芳香族炭化水素は様々な化合物に代謝され、長時間体内に残存することがある。発癌性、変異源性を持つベンゾピレンなどの高分子芳香族は、魚体内でDNAに結合する誘導体に変換されるため、高度に汚染された水域に棲息するヒラメ、カレイ類にみられる腫瘍との関連性が示唆されている¹³⁾。カキ及びイガイにおける有機硫黄化合物の半減期はそれぞれ約12日、4日と報告されているが⁹⁾、本研究におけるマダイ及びクルマエビにおけるジベンゾチオフェンの半減期は、およそ2.3日と推定された。これらの結果より、有機硫黄化合物は貝類より魚類において、より活発に代謝されることが考えられるが、その代謝経路など不明な点が多く、さらに詳細な研究が必要であると思われる。ベンゾチオフェンやジベンゾチオフェンは生体の細胞内においてミトコンドリアの膜に作用して、その機能を傷害することも知られている⁸⁾。したがって、有機硫黄化合物は海洋への原油流出後長期にわたり海中に残存し、生物体内に濃縮され、様々な障害を起こす一因となる可能性を有する。

6. まとめ

(1)クウェート原油水溶性画分の主要成分及びそれらの消長を明らかにし、ナフタレンなどの多環芳香族類はその毒性、残留性の点から特に注意を要する物質であることを示した。また、クウェート原油水溶性画分は海産魚類および甲殻類に対して非常に強い毒性を発揮することを示した。

(2)マダイ及びクルマエビに対する低沸点芳香族炭化水素類の24時間半数致死濃度は、ほぼ等しかったが、ナフタレンに対してはマダイの方が感受性が高くなる傾向がみられた。クウェート原油水溶性画分の毒性は貯蔵中に減少したが、これは低沸点芳香族類が揮発したためであると考えられた。原油水溶性画分中の有機硫黄化合物のうち低沸点化合物は原油の除去後海水中から消滅したが、高沸点化合物は原油を除去しても長期間残留した。

(3)マダイ及びクルマエビのジベンゾチオフェンに対する96時間半数致死濃度はそれぞれ0.15 mg/l、0.47 mg/lであった。また、本化合物の濃縮率は、6週間の暴露によりマダイで約900倍、クルマエビで約180倍であった。蓄積したジベンゾチオフェンの半減期は両生物とも約2.3日であった。

7. 本研究により得られた成果

(1)クウェート原油水溶性画分の主要成分の消長を明らかにし、ナフタレン類はその毒性、残留性の点から特に注意を要する物質であることを示した。また、クウェート原油水溶性画分は海産魚類および甲殻類に対して非常に強い毒性を発揮することを示した。

(2)マダイとクルマエビに対するベンゼン、トルエン、及びナフタレンの24時間半数致死濃度を明らかにし、これらの成分は海産生物に対して非常に強い急性毒性を持つことを示した。クウェート原油は貯蔵中にも低沸点成分が揮散し、その急性毒性が低減することが推測された。原油水溶性画分中の有機硫黄化合物を分析し、低沸点成分は原油除去後海水中から消滅するが、ジベンゾチオフェンなどの高沸点成分は原油除去後も残留することを明らかにした。

(3)有機硫黄化合物の一種であるジベンゾチオフェンのマダイ及びクルマエビに対する急性毒性値

は既報の淡水ヒメダカに対するそれよりも著しく低いことが分かった。海水中に溶存するジベンゾチオフェンはマダイやクルマエビの体内に濃縮され、蓄積されることを明らかにした。これらの結果から原油流出事故後長期間にわたりジベンゾチオフェンなどの高沸点有機硫黄化合物による海洋生物への影響が懸念されることを指摘した。

8. 参考文献

- 1) Thomas, P. 1987. Influence of some environmental variables on the ascorbic acid status of striped mullet, Mugil cephalus Linn., tissues. III. Effects of exposure to oil. J. Fish Biol., **30**, 485-494.
- 2) Moles, A. and Rice, S. D. 1983. Effects of crude oil and naphthalene on growth, caloric content, and fat content of pink salmon juveniles in seawater. Trans. Amer. Fish. Soc., **112**, 205-211.
- 3) Fletcher, G. L., Kiceniuk, J. W., King, M. J., and Payne, J. F. 1979. Reduction of blood plasma copper concentrations in a marine fish following a six month exposure to crude oil. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **22**, 548-551.
- 4) Russell, L. C. and Fingerman M. 1984. Exposure to the water soluble fraction of crude oil or naphthalenes alters breathing rates in gulf killifish, Fundulus grandis. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **32**, 363-367.
- 5) Roubal, W. T., Stranahan, S. I., and Malins, D. C. 1978. The accumulation of low molecular aromatic hydrocarbons of crude oil by coho salmon (Oncorhynchus kisutch) and starry flounder (Platichthys stellatus). Arch. Environ. Contam. Toxicol., **7**, 237-244.
- 6) Moles, A., S.D. Rice, and S. Korn, 1979. Sensitivity of Alaskan freshwater and anadromous fishes to Prudhoe Bay crude oil and benzen. Trans. Amer. Fish. Soc., **108**, 408-414.
- 7) Moles, A. 1980. Sensitivity of parasitized coho salmon fly to crude oil, toluene, and naphthalene. Trans. Amer. Fish. Soc., **109**, 293-297.
- 8) 緒方正名、長谷川亨, 1982. ベンゾチオフェン、ジベンゾチオフェンの和金肝ミトコンドリアに対する作用. 医学と生物学, **104**(4), 247-249.
- 9) Ogata, M. and K. Fujisawa, 1985. Organic sulfur compounds and polycyclic hydrocarbons transferred to oyster and mussel from petroleum suspension, Identification by gas chromatography and capillary mass chromatography, Water Res., **19**(1), 107-118.
- 10) Kira, S., M. Izumi and M. Ogata, 1983. Detection of dibenzothiophene in mussel, Mytilus edulis, as a marker of pollution by organosulfur compounds in a marine environment. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **31**, 518-525.
- 11) 化審法の既存化学物質安全性点検データ集 1992, 財団法人化学品検査協会編集, p.5-46.
- 12) Ogata, M. and K. Fujisawa, 1983: Capillary GC/MS determination of organic sulfur compounds detected in oyster and mussel caught in the sea by capillary mass

chromatography as oil pollution index, *Chromatogr. Sci.*, **21**, 420-424.

- 13) Varanasi, U. and D. J. Gmur, 1981: Hydrocarbons and metabolites in English sole (*Paraphrys vetulus*) exposed simultaneously to [³H]benzo[a]pyrene and [¹⁴C]naphthalene in oil-contaminated sediment. *Aquat. Toxicol.*, **1**, 49-67.