

D-2 有害化学物質による地球規模海洋汚染の動態解析と予測に関する研究

(2) 有害化学物質の環境中での分解・変質と有害性評価に関する研究

独立行政法人産業技術総合研究所

環境管理技術研究部門 計測技術研究グループ

田尾博明・中里哲也・伊藤信靖・

Ramaswamy Babu Rajendran

東京薬科大学生命科学部

藤原祺多夫

静岡県立大学環境科学研究所

橋本伸哉

平成15～17年度合計予算額 27,483千円
(うち、平成17年度予算額 8,490千円)

[要旨] 多環芳香族炭化水素 (PAHs) は燃焼等に伴って大量に放出され有害なものも多い。また、紫外線等により水酸化体に変換され、内分泌攪乱作用を示すものもあり、今後の監視が必要な化学物質の一つである。しかし、PAHs水酸化体 (以後OH-PAHsと略) に関する報告は僅かしかいないため、本研究ではOH-PAHsの海洋中での変質・分解過程の解明、内分泌攪乱性の評価手法の確立を通じて、モニタリング手法の確立、海洋環境におけるOH-PAHsの汚染実態と運命を明らかにすることを目的とした。このためOH-PAHsの分析法として、OH-PAHsを無水酢酸により誘導体化後、吸着剤被覆回転子により抽出し、熱脱着-GC/MS法を開発した。また、TENAX樹脂による固相抽出/in-tubeシリル化/熱脱着-GC/MS法を開発し、検出限界として0.01 ng/Lと約1000倍の高感度化を実現した。光分解性に関しては、太陽光シミュレーターを用いてアントラセン、ピレン等の分解生成物を同定し、分解速度に及ぼす共存物質やメチル置換基の効果を明らかにした。内分泌攪乱作用に関しては、酵母を用いる方法によりアントラセンやナフタレンの光反応生成物である約30種類のOH-PAHsを評価した。その結果、2-ヒドロキシアントラキノン、17β-エストラジオールの1/8000、p-ニルフェノールの0.4倍のエストロジェン・アゴニスト活性を有することが分かった。また、OH-PAHsの中にはラット肝臓で代謝された後、エストロジェン活性を示すものがあり、PAHsの光反応生成物が新たな内分泌攪乱物質の起源となることを示した。これらの手法を実海水に適用し、海水濃度とエストロジェン様活性から各化学物質の寄与率を求めた。駿河湾海水での主なエストロジェン様活性物質は、エストロン (≤9.2 ng/L)、ビスフェノールA (≤1070 ng/L)、p-ニルフェノール (≤276 ng/L) であり、OH-PAHsの寄与率は低かった。しかし、海域によっては、石油流出事故などによりPAHs濃度が上昇し、太陽光照射等によってOH-PAHsが生成する可能性があり、今後も多様な海域を対象として研究を進めていくことが必要と考えられた。

[キーワード] 内分泌攪乱物質、海洋汚染、多環芳香族炭化水素、水酸化体、環境動態

1. はじめに

人為起源有害化学物質による海洋汚染は広域化し、海洋生態系への影響が懸念されている。2001年に残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約 (POPs条約) が成立し、これらの化学物質の地球規模での監視が盛り込まれている。有害化学物質はそれ自身の有害性もさること

ながら、環境において変質し、より有害性の高い物質を生じる可能性が懸念されることから、海洋環境における変質過程の解明とその有害性評価が重要となっている。多環芳香族炭化水素（PAHs）は燃焼に伴って大量に放出され、その毒性も高いことから、総体としての有害性は相当大きいと考えられている。さらに、発生源から遠く離れた環境で採取された試料からもPAHsが検出されていることから¹⁾、今後、環境研究において最も注目すべき化学物質の一つである。PAHsは紫外線やヒドロキシラジカルによって水酸化体やキノン体を生成することが知られており²⁾、また、その化学構造から内分泌攪乱作用の可能性も指摘されている。しかしながら、これらの環境中の挙動に関する報告はほとんどない。このため、光化学反応によってPAHsからOH-PAHsが生成される過程を明らかにするとともに、実環境中で共存する物質の影響を明らかにすることが必要である。また、環境中からはこれまでも幾つかのエストロジェン様活性物質が検出されており、それらの化学物質が生物に及ぼす悪影響が懸念されている。環境試料中に観察されるエストロジェン様活性の大部分が、 17β -エストラジオール、エストロン、 17α -エチニルエストラジオールなどの天然および合成のステロイドエストロジェンによるものであることが、いくつかの研究で示されている。しかしながら、数多く存在する既知の内因性および外因性のエストロジェンだけでは、それらの活性を説明することが不可能であることを示唆している報告例もある。本研究では、よく知られた 17β -エストラジオール、エストロン、*p*-ノニルフェノール、ビスフェノールAなどの天然および合成のエストロジェン様物質だけでなく、PAHsやその水酸化体（OH-PAHs）にも着目した。各化学物質のエストロジェン様活性の総体に対する寄与率を明らかにするため、海水中濃度を明らかにするとともに、各化学物質のエストロジェン様活性を評価し、実環境において、それらの積として個々の化学物質のエストロジェン様活性を求め、その寄与率を評価した。

2. 研究目的

本研究では、海洋環境におけるOH-PAHsの汚染実態と運命を明らかにすること、海域において各化学物質のエストロジェン様活性を評価し、エストロジェン様活性総体に占める寄与率を明らかにすることにより、今後の環境モニタリングに対する指針を得ることである。このため、海水中でのOH-PAHsの分析方法の確立、海洋中での変質・分解過程の解明、及び内分泌攪乱性の評価手法の確立を目指した。さらにこれらの手法を、今後の国際的な海洋汚染モニタリング手法への活用も目指している。

初年度は、これらの研究の基礎となる、極微量PAH水酸化体の定量方法の開発、太陽光シミュレーターを用いて海水中のPAHの分解速度、及び分解速度に及ぼす共存フミン物質の影響を明らかにすること、さらに、酵母two hybrid法によるエストロジェン様活性の評価及び精度管理手法の確立を目的とした。次年度は、初年度に開発したアセチル化／吸着剤被覆回転子抽出／熱脱着-GC/MS法を用いて、都市域天然水、近海域のPAH水酸化体の測定を行うこと、また、遠洋海水に適用するため、TENAX樹脂による固相抽出／in-tubeシリル化／熱脱着-GC/MS法を開発し、前法に比べて約1000倍の高感度化を実現することを目的とした。また、光分解に関しては、太陽光シミュレーターを用いて、アントラセン、ピレン等の分解速度及び分解生成物を明らかにすること、さらに、内分泌攪乱作用に関しては、初年度にはアントラセン系の水酸化体を、次年度にはナフタレン系の水酸化体の活性を明らかにすることを目的とした。最終年度は、これまで開発してきた分析方法、エストロジェン様活性評価手法を用いて、実際の海域に適用し、海域の総体として

のエストロゲン様活性の測定と各PAH水酸化体の占める割合を明らかにして、未解明であったPAH水酸化体の有害性を評価することを目的とした。

3. 研究方法

(1) 極微量 PAH 水酸化体の定量方法の開発

①試薬・器具： PAH 水酸化体として、OH-ナフタレン（OH-naphthalene 2種、OHNPと略）、diOH-ナフタレン（diOH-naphthalene 7種、diOHNPと略）、OH-フェナントレン（OH-phenanthrene 1種、OHPTと略）、OH-ピレン（OH-pyrene 1種、OHPRと略）、OH-フルオレノン（2種、OHFRと略）、OH-アントラキノン（2種、OHAQと略）、diOH-アントラキノン（5種、diOHAQと略）、triOH-アントラキノン（1種、triOHAQと略）の計21種類を検討した。本研究における対象化合物の構造式を図1に示した。これらの標準液は各試薬をアセトニトリルに溶解した後、適宜希釈して使用した。内部標準として、フェナントレン-d₁₀（phenanthrene-d₁₀）を用いた。ポリジメチルシロキサン（Polydimethylsiloxane）でコーティングされたスターバー（商品名：ツイスター；液相：24 μl）は Gerster 社より購入した。アセチル化剤には無水酢酸を、またシリル化剤には、N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide（BSTFA）を用いた。

②装置： 熱脱着装置（TDS-2, Gerstel 社製）およびコールドトラップ部（CIS-4, Gerstel 社製）は GC のインジェクター部分に設置し、GC-MS は GC6890/5973（Agilent 社製）を用いた。アセチル化体の分析カラムは DB-5MS（30 m×0.25 mm I.D.×0.25 μm film thickness）を用いた。熱脱着装置は溶剤モードで初期温度 20 °C から 300 °C まで 60 °C/min で昇温させた。コールドトラップ部は初期温度の -80 °C から 300 °C まで 12 °C/s で昇温させた。GC オープンのプログラムは 50 °C（保持時間：2 min）から 300 °C（保持時間：5 min）まで 5 °C/min で昇温した。カラム流量は 1 ml/min とした。シリル化体の分析カラムは HP-5MS（30 m×0.25 mm I.D.×0.25 μm film thickness）を用いた。キャリアガス流速は He 1 mL/min、オープン は 50 °C（3 分間保持）から 300 °C まで 10 °C/min で昇温し、300 °C で 10 分間保持した。質量分析部のイオン化は電子衝撃（EI）法でイオン化エネルギーは 70 eV とした。

③分析操作

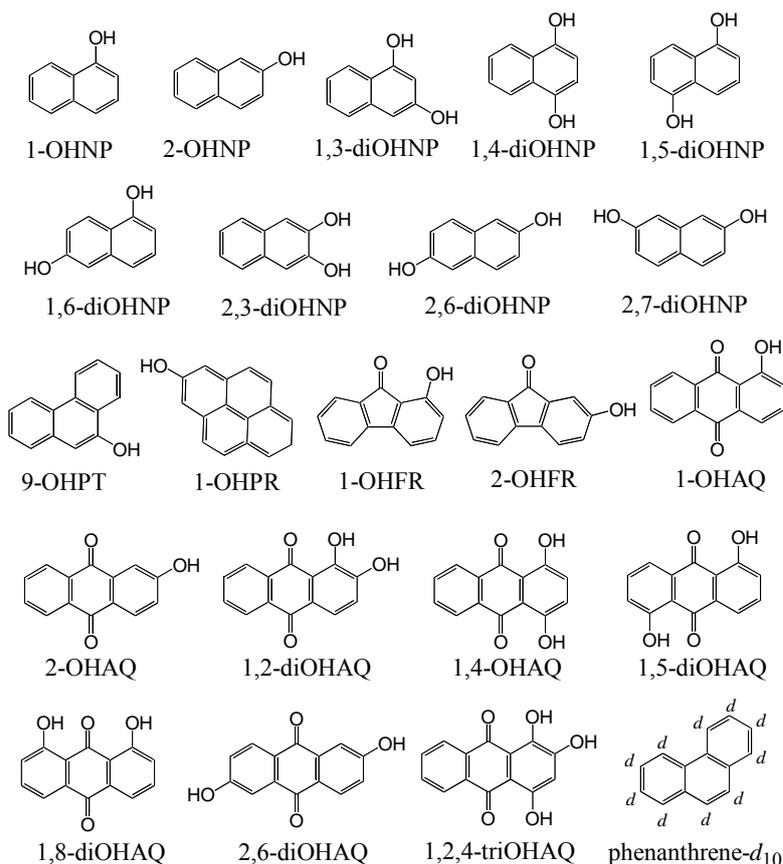


図1 多環芳香族炭化水素の構造式

ア アセチル化/吸着剤被覆回転子抽出/熱脱着-GC/MS法： 無水酢酸を10 mLの人工海水5 mLに添加し、OH-PAHsをアセチル化した後、遮光下で吸着剤被覆回転子（ツイスター）を1,000 rpmで回転させて吸着させた。これを熱脱着-GC/MS法を分析した。

イ TENAX樹脂による固相抽出/in-tubeシリル化/熱脱着-GC/MS法：まず、海水試料を0.45 μmのフィルターで濾過し、1M HClでpH2に調整した。この試験液（100 mL）をTENAX TAを詰めた熱脱着管に通水（2 mL/min）し、窒素ガスで十分に乾燥した後、熱脱着（TD）-GC/MSに供与した。シリル化反応はTDチューブ内で行い、シリル化剤蒸気を安定に供給するため、キャピラリーを用いる方法を開発した。これによりTENAX樹脂に吸着されたPAH水酸化体を定量的にシリル化できた。シリル化されたものは、TDユニットを加熱して脱着しGC/MSで分析した。検出限界として0.01 ng/Lとアセチル化法に比べて約1000倍の高感度化を実現した。

(2) 太陽光シミュレーターを用いる光分解過程の解明

光分解性に関しては、図2に示す太陽光シミュレーター（ORIEL社製、出力150 W）を用いてアントラセン、ピレン等の分解生成物を同定し、分解速度に及ぼす共存物質やメチル置換基の効果を明らかにした。

測定条件
移動相: Acetonitrile 100%
流速: 0.5ml/min
検出: UV240nm
注入量: 10 μL

PAHはアセトニトリルに溶解し、pH7.5のリン酸緩衝液で希釈した

測定条件
移動相: Acetonitrile 100%
流速: 0.5ml/min
検出: UV240nm
注入量: 10 μL

マグネチックスターラー?

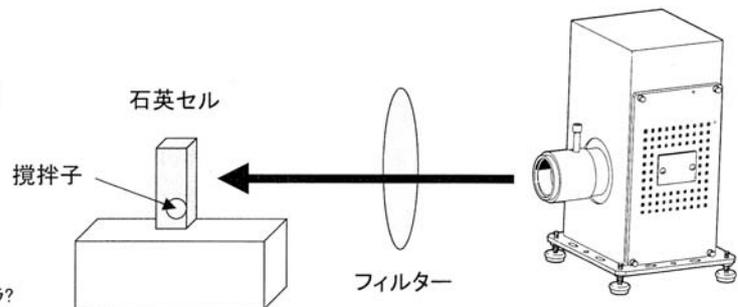


図2 太陽光シミュレーターによる光分解実験装置の概略

（アセトニトリル20%、PAH濃度1 ppm）。この溶液を石英製セルに入れ、太陽光シミュレーターで30 cmの距離で真横からエアマスフィルター（AM0, AM1.5）を通して光を照射した。15分間隔で反応溶液を採取し、高速液体クロマトグラフ（HPLC）でPAHsの濃度を測定し、PAHsの残存率が20%以下になるまで測定を続けた。

(3) エストロジェン様活性（雌性ホルモン様活性）の評価

エストロジェン様活性は、2つのプラスミドが導入された酵母Y190株を用いた*in vitro*バイオアッセイ系で評価した。実験は、96穴プレート培養法と、化学発光レポーター遺伝子測定法を組み合わせた方法で行った。また、これらの化合物が生体内で代謝された場合の活性を、薬物代謝酵素を用いて評価した。すなわち、化合物そのものの活性を評価する試験を-S9試験と定義し、化合物をラット肝臓S9によって代謝させた産物の活性を評価する試験を+S9試験と定義した。-S9試験には17β-エストラジオール、+S9試験にはtrans-スチルベンを各々ポジティブコントロールとして使用した。なお、化学物質によって阻害される海洋発光細菌（*Photobacterium phosphoreum*）の生物発光量を測定し、急性毒性の評価も行った。本法によりアントラセンやナフタレンの光反応生成物であるアントラキノン（ATQ）や、水酸基を1~3つ有する水酸化ATQなど約30種類のOH-PAHsのエストロジェン様活性を評価した。

(4) 海水試料の分析とエストロジェン様活性の総合評価

海水試料採取は、サブテーマ1で採取した外洋海水の他、駿河湾、東京湾等でも実施した。駿河湾海水試料採取地点を図3に示した。Station 1と5は、漁港である。Station 2は下水処理場の放流水が放出される場所付近に位置し、station 3は下水処理場付近に位置している。Station 4は周囲に多くの製紙工場が存在する田子の浦港の湾口部に位置している。表層海水は、

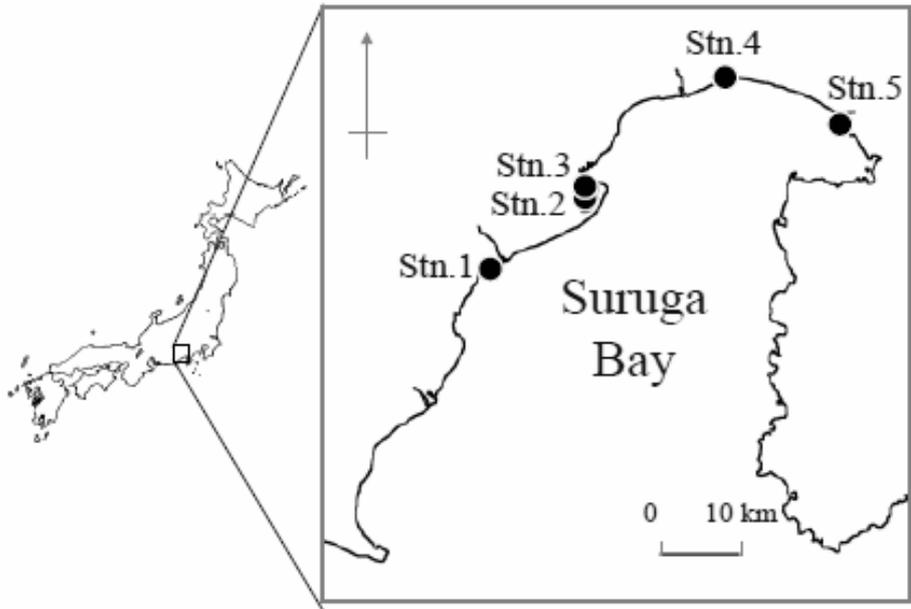


図3 駿河湾海水の試料採取地点

ステンレス製の採水用バケツで採取した。化学分析およびバイオアッセイに用いるため、3,000 mLの海水に濃塩酸を添加し、海水のpHを調整した。海水試料はガラスフィルターを用いてろ過した後、3M社製のエムポアディスク (C18) を用いて、抽出した。その後、有機溶媒を用いて化学物質を溶出させ、溶出液を無水硫酸ナトリウムのカラムを通し、脱水した。その有機相をロータリーエバポレーターにより28℃以下の条件下で濃縮し、バイオアッセイと化学分析に用いた。

対象化合物の化学分析は以下のように行った。上述した海水試料の抽出液を窒素流により濃縮し、溶媒を20%のピリジンを含む200 μLのアセトニトリルに変換した。この溶液の半分は、ナフタレン、フルオレン、9-フルオレノン、アントラセン、アントラキノン、ピレンなどの水酸基をもたない化学物質の分析に使用した。また、残りの半分は、水酸基を有する化合物の分析に使用した。これらの水酸基を有する化学物質は、(1)で開発したシリル化剤にBSTFAを用いるin-tubeシリル化／熱脱着-GC/MS法により分析した。各海水試料の分析は3回行った。海水試料のエストロジェン様活性は、海水2,000 mLを最終的に200 μLのDMSOに溶解し、(3)で開発した酵母two-hybridシステムにより評価した。

4. 結果・考察

(1) 極微量 PAH 水酸化体の定量方法の開発

①アセチル化／吸着剤被覆回転子抽出／熱脱着-GC/MS法

最近、図4に示すような疎水性の吸着剤

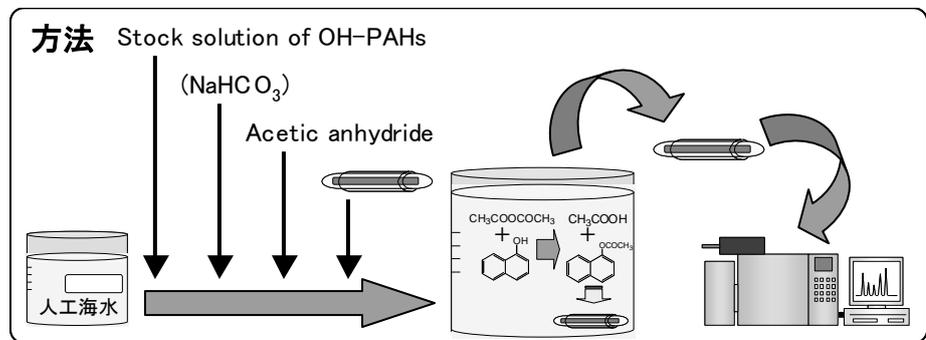


図4 SBSE法／熱脱着-GC/MS法によるOH-PAHs定量スキーム

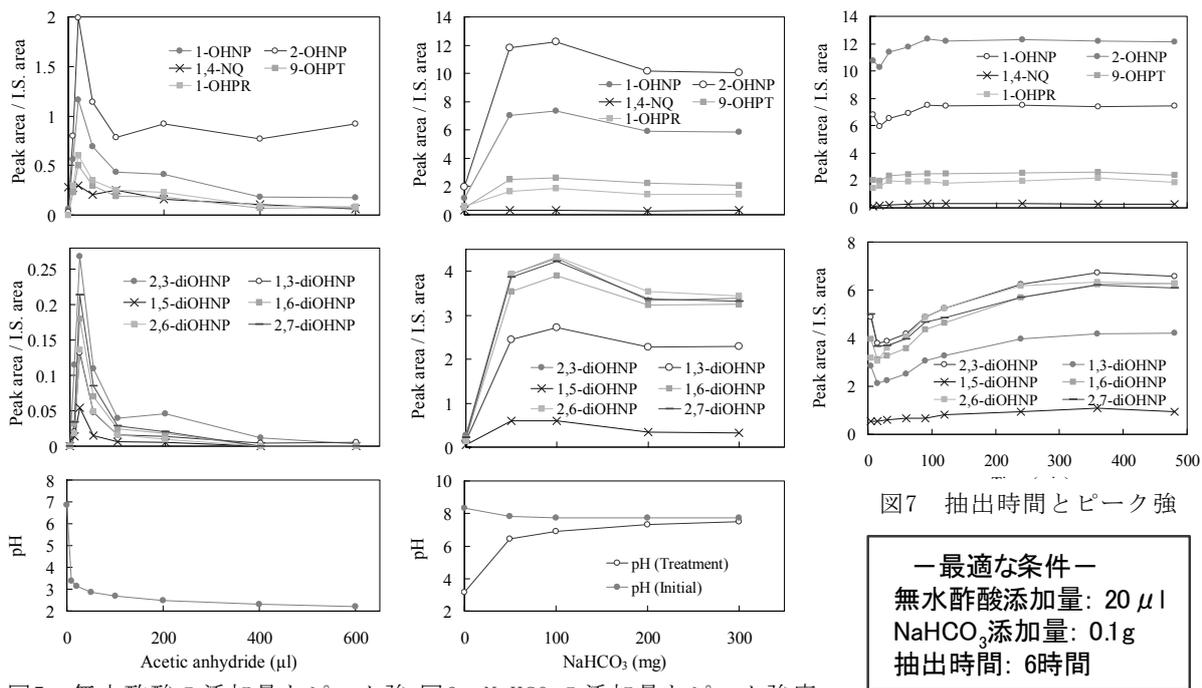


図5 無水酢酸の添加量とピーク強 図6 NaHCO₃の添加量とピーク強度

(ポリジメチルシロキサン) で被覆した回転子を水中で攪拌して分析対象物質を抽出 (SBSE 法) した後、熱脱着-GC/MS 法で分析する方法が、簡便かつ高感度な分析法として注目されている。しかし、OH-PAHs は、親化合物である PAHs に比べて極性が高く、SBSE 法の適用が困難であった。そこで本研究では、海水中の OH-PAHs を誘導体化した後、この方法を適用することを試みた。

誘導体化法としては、無水酢酸、BSTFA、フェロセン化合物、ヨウ素化合物を用いる方法を検討した結果、フェロセン化合物及びヨウ素化合物 (4-Iodobenzyl chloride, 2-Iodobenzyl chloride, Iodoacetyl chloride) を用いた誘導体化では、誘導体化反応は進むが、生成物の沸点が高くなるため、GCの保持時間が大幅に長くなり (未誘導体化物ではカラムオープンが180°C付近で流出するのに対し、誘導体化されたものは300°Cに達してから流出) 定量が困難であった。また、BSTFAは水分があると反応してしまうため、直接海水中で使用することはできない。このため、無水酢酸による誘導体化 (アセチル化) を選択し、その最適条件を求めた。

OH-PAHs を含む人工海水に無水酢酸を直接添加することにより、1,4-diOH-naphthalene を除く、すべての OH-PAHs がアセチル化されることが分かった。まず、無水酢酸の添加量を 10μL から 600μL まで変化させてアセチル化への影響を調べた結果、図 5 に示すように OH-PAHs のアセチル化されたピークは、添加量が 20 μL の時に最大となった。100μL 添加時の pH は、20μL 添加時と比べてわずか (pH3.14→pH2.67) しか減少していないにもかかわらず、ピーク面積は半分以下になった。大部分の OH-PAHs は、100μL 以降、添加量の増加とともにピーク面積が減衰した。これらのことから、無水酢酸の過剰添加は、エステル部分の加水分解ではなく、むしろ回転子に被覆した吸着剤の吸着能を減少させることが示唆された。次に、アセチル化の直前に人工海水中に NaHCO₃ を添加 (0.05-0.3 g) し、アセチル化反応への影響を調べた。図 6 に示すようにいずれの場合も、無添加の場合と比べてピーク面積が大きく増加したが、0.1 g を添加したときにアセチル化が最も促進された (2-31 倍)。これに対し、OH 基を持たない 1,4-naphthoquinone は NaHCO₃ の

添加による影響を受けなかった。このことから、予め人工海水に NaHCO_3 を添加することにより、OH-PAHs の OH 基が活性化され、アセチル化が促進されたものと考えられた。以上のことから、無水酢酸の添加量が $20\mu\text{L}$ で NaHCO_3 の添加量が 0.1 g のとき、海水中の OH-PAHs を最も効率良くアセチル化できることが分かった。この最適な誘導体化条件下で、吸着平衡に達するまでの時間を検討した。図 7 に示すように抽出開始から 4 時間でいずれのアセチル化 OH-PAHs もほぼ吸着平衡に達した。これまでに得られた最適条件下において、人工海水中のアセチル化 OH-PAHs を sub-ppb オーダーで定量できることが分かった。本法で得られた検出下限値を表 1 に示す。また、本法を天然水や海水に適用した場合のクロマトグラムを一例を図 8 に示す。

②TENAX 樹脂による固相抽出/in-tube シリル化/熱脱着-GC/MS 法

我々は初年度、OH-PAHs を定量する方法として、無水酢酸によるアセチル化後、吸着剤被覆回転子に抽出し、これを熱脱着装置 (TD) を接続した GC-MS 装置で分析する方法 (アセチル化/

表1 各OH-PAHsの $\text{pK}_{\text{O/W}}$ と検出下限値

	Compound	$\text{pK}_{\text{O/W}}^a$	R	LOD ($\mu\text{g/l}$)
<i>a</i>	1,4-NQ	1.66	0.998	2.08
<i>b</i>	1-OHNP	2.29	1.00	0.206
<i>c</i>	2-OHNP	2.29	0.999	0.930
<i>d</i>	Phenanthrene- <i>d</i> ₁₀	4.35	—	—
<i>e</i>	2,3-diOHNP	1.40	1.00	0.514
<i>f</i>	1,3-diOHNP	1.40	0.996	1.64
<i>g</i>	1,5-diOHNP	1.40	0.969	7.46
<i>h</i>	1,6-diOHNP	1.40	0.998	1.73
<i>i</i>	2,6-diOHNP	1.40	1.00	0.570
<i>j</i>	2,7-diOHNP	1.40	0.995	2.10
<i>k</i>	9-OHPT	3.46	0.998	1.04
<i>l</i>	1-OHPR	4.05	0.997	0.906

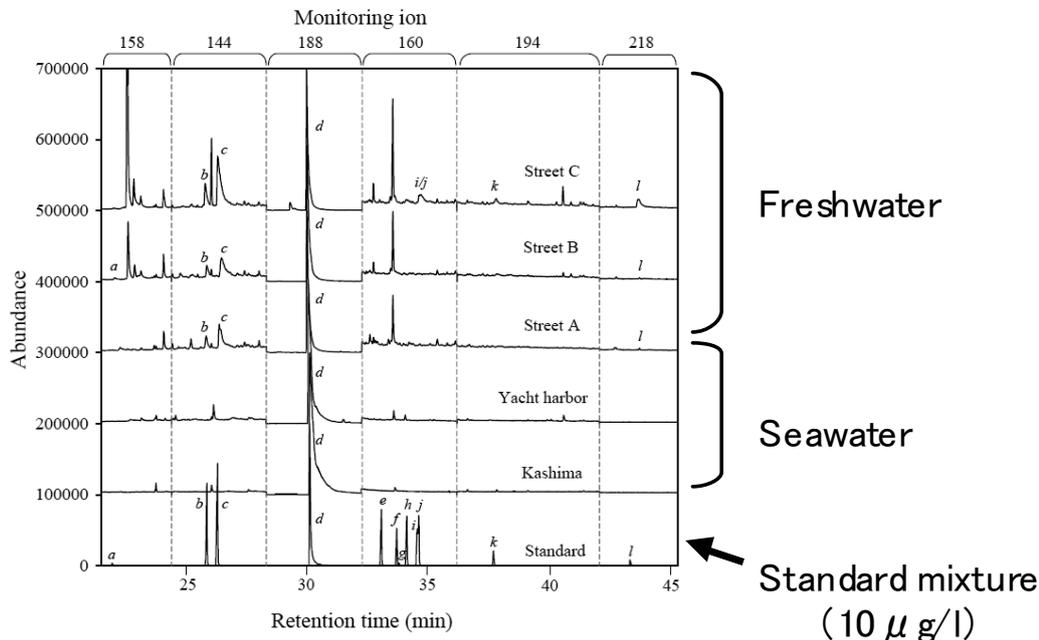
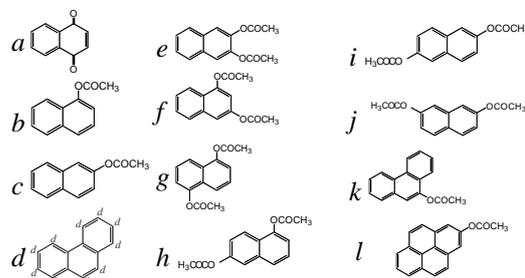


図8 標準物質と環境試料のクロマトグラム

吸着剤被覆回転子抽出/熱脱着-GC/MS 法) を開発した。この方法では、煩雑な前処理を必要とせず高感度化 (0.01 ppb レベル) を達成したが、一方で、誘導体化できない化合物も存在することや、適用可能な海水量は 10 mL 程度に限定されるため、外洋海水のような極低濃度試料には感度が不足することなどの問題点が明らかになった。そこで、この方法の欠点を克服した、高感度

な
OH-PAH
s 定量法
の開発を
行った。
開発する
手法では、
海水中の
PAHs を
直接誘導
体化する
のではなく、一旦
TENAX
等の固相
吸着剤に

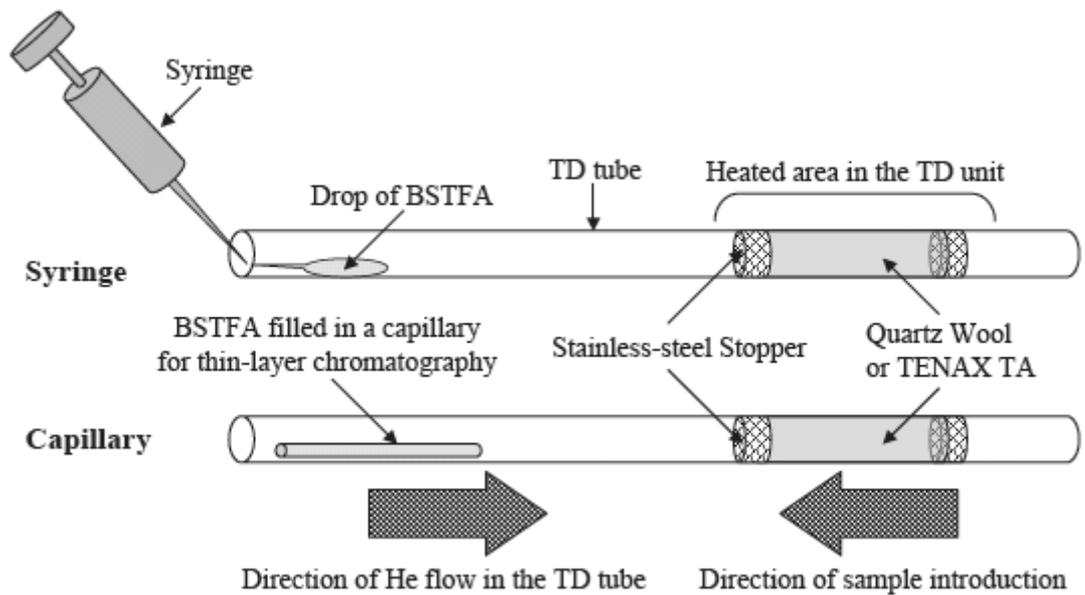


図9 BSTFA蒸気によるin-tubeシリル化法：シリンジ注入とキャピラリーチューブ導

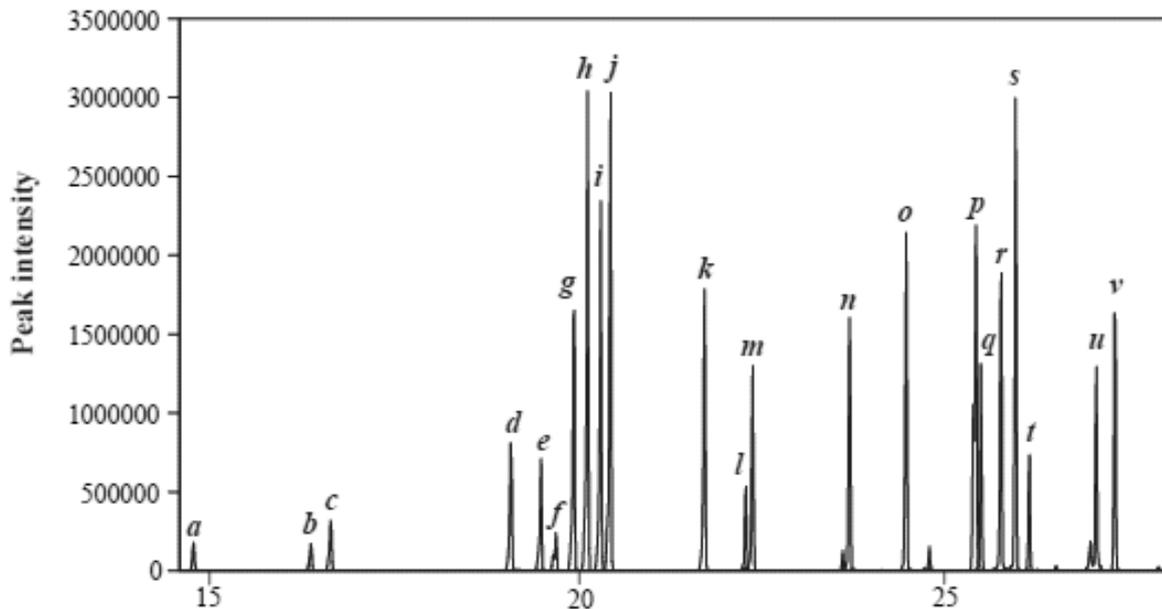


図10 シリル化体のGC/MS クロマトグラム(100 $\mu\text{g L}^{-1}$ of each OH-PAHs)

a, 1,4-NQ; b, 1-TMS-O-NP; c, 2-TMS-O-NP; d, phenanthrene- d_{10} ; e, 2,3-diTMS-O-NP; f, 1,3-diTMS-O-NP; g, 1,5-diTMS-O-NP; h, 1,6-diTMS-O-NP; i, 2,7-diTMS-O-NP; j, 2,6-diTMS-O-NP; k, 1-TMS-O-FR; l, 9-TMS-O-PT; m, 2-TMS-O-FR; n, 1-TMS-O-AQ; o, 2-TMS-O-AQ; p, 1,4-TMS-O-AQ; q, 1-TMS-O-PR; r, 1,5-diTMS-O-AQ; s, 1,8-diTMS-O-AQ; t, 1,2-diTMS-O-AQ; u, 1,2,4-triTMS-O-AQ ($\times 100$); v, 2,6-diTMS-O-AQ.

抽出した後、これを熱脱着管内で誘導体化し、その全量を GC/MS に導入して測定することにより、簡便性と高感度性を満足させることを目指した。従って、この方法ではシリル化剤 (BSTFA) 蒸気による熱脱着管内での誘導体化 (in-tube シリル化) と TD-GC-MS 法をオンラインで組み合わ

表2 TENAX樹脂による固相抽出/in-tubeシリル化/熱脱着-GC/MS法の検出下限値、定量下限値、回収率

Compound	Retention time (min)	Ion mass	Correlation coefficient (R) ^a	Detection limit (pg L ⁻¹) (S/N=3)	Quantification limit (pg L ⁻¹) (S/N=10)	Recovery (%) ^b (mean ± RSD)
1,4-NQ	14.84	<u>158</u> , 130, 104, 102, 76	0.999	2.0×10 ²	6.7×10 ²	82 ± 11
1-TMS-O-NP	16.45	<u>216</u> , 201, 185, 141, 115	1.00	6.6	22	85 ± 6
2-TMS-O-NP	16.71	<u>216</u> , 201, 185, 145, 115	1.00	8.0	27	88 ± 6
2,3-diTMS-O-NP	19.64	<u>304</u> , 289, 216, 186, 73	0.997	21	69	67 ± 16
1,3-diTMS-O-NP	19.82	<u>304</u> , 289, 273, 114, 73	0.997	21	68	57 ± 47
1,5-diTMS-O-NP	20.05	<u>304</u> , 289, 273, 201, 73	0.998	13	42	9 ± 42
1,6-diTMS-O-NP	20.26	<u>304</u> , 289, 273, 201, 73	0.999	5.5	18	11 ± 42
2,7-diTMS-O-NP	20.47	<u>304</u> , 289, 233, 137, 73	1.00	6.0	20	16 ± 36
2,6-diTMS-O-NP	20.62	<u>304</u> , 289, 261, 137, 73	0.999	6.2	21	9 ± 36
1-TMS-O-FR	21.9	<u>253</u> , 235, 223, 151, 119	1.00	4.1	14	106 ± 4
9-TMS-O-PT	22.46	<u>266</u> , 251, 235, 165, 73	0.998	4.5	15	128 ± 11
2-TMS-O-FR	22.55	268, <u>253</u> , 139, 165, 73	1.00	10	34	121 ± 5
1-TMS-O-AQ	23.86	<u>281</u> , 251, 264, 223, 151	1.00	19	64	85 ± 9
2-TMS-O-AQ	24.65	296, <u>281</u> , 253, 151, 73	1.00	18	59	106 ± 5
1,4-diTMS-O-AQ	25.54	369, <u>354</u> , 324, 294, 162	1.00	14	46	81 ± 7
1-TMS-O-PR	25.68	<u>290</u> , 275, 259, 189, 73	0.999	7.3	24	36 ± 86
1,5-diTMS-O-AQ	25.92	369, <u>354</u> , 324, 297, 177	0.998	54	1.8×10 ²	66 ± 14
1,8-diTMS-O-AQ	26.09	<u>369</u> , 297, 240, 207, 73	0.998	43	1.4×10 ²	84 ± 8
1,2-diTMS-O-AQ	26.23	<u>369</u> , 341, 281, 207, 73	0.987	5.0×10 ²	1.7×10 ³	273 ± 15
1,2,4-triTMS-O-AQ	27.21	<u>442</u> , 253, 207, 281, 73	0.991	1.2×10 ³	3.9×10 ³	304 ± 13
2,6-diTMS-O-AQ	27.47	384, <u>369</u> , 297, 177, 73	0.999	47	1.6×10 ²	90 ± 5

Results were obtained under Combination VII in Table 1.

Underlined masses were used for estimating correlation coefficient, detection limit, quantification limit and recovery.

a, Regression coefficients were calculated from seven concentrations (0–50 µg L⁻¹).

b, Recovery was estimated from 100 mL of spiked 3% NaCl solution (final concentration: 100 ng L⁻¹).

せる。誘導体化や熱脱着装置、GC/MS の最適条件を詳細に検討した後、TENAX 樹脂用いた固相抽出法と組み合わせ海水試料に応用した。

本法の開発の要点は、BSTFA蒸気によるシリル化を如何に効率的に実現するかである。BSTFA溶液をシリンジで供給する従来法では、BSTFAの蒸気圧が高く、かつ経時的に溶液表面積が変化するため、一定量の蒸気量を供給することが困難であった。このため図9に示すようにBSTFAをキャピラリーに導入し、これをTD管に導入する方法を考案した。この方法では蒸発面がキャピラリー両端に限定されるため、常に一定量の蒸気を供給することができる。図10に示すように、本法によって図1に示した21種類のOH-PAHsがGCで分離できた。本法の昇温速度は、前年度のアセチル化体の2倍 (10 °C/min) としたが、むしろ各ピークの分離は良好であった。一部のピークは近接していたが、本法ではSCANモードで測定しており、同定・定量に問題はなかった。本法で得られた検出下限値、定量下限値、回収率 (100 mLの人工海水に各OH-PAH濃度が100 ng/Lとなるように添加した試料からの回収率) 等のデータを表2に示す。前年度のアセチル化を用いる方法の検出限界は約0.01 ppbであったが、本法では0.01 pptと約1000倍改善された。これはTENAX樹脂を用いることによって、試料量を5 mLから100 mLに20倍増加させても十分な回収率が得られたこと、シリル化体がアセチル化体比べてピークが鋭く、かつ質量分析においてフラグメントが生じにくいことため感度が高いことに起因している。なお、シリル化法では直鎖脂肪酸 (C₁₂, C₁₆, C₁₈, C₂₀, C₂₂) やビスフェノールA等もシリル化することが可能であるため、本法はこれらのスクリーニングにも使用できる。

以上のように開発した分析方法を実際の環境試料に適用し、OH-PAHs及びその親化合物となるPHAsを測定した。まず、初年度にアセチル化/吸着剤被覆回転子抽出/熱脱着-GC/MS法を実試料

に適用した場合の測定結果を表3に示す。実試料から観測される主な化合物は、1,4-NQ, 2-OHNP, 2,3-diOHNP, 1,5-diOHNP, 1,3-diOHNP, 9-OHPTであった。都市域の天然水、近海域では1,3-diOHNP濃度が最も高く、都市道路面で1 ppb、港湾で0.1 ppbであったが、サブテーマ(1)で採取した太平洋海水試料では検出限界 (0.01 ppb) 以下であり、陸から離れるにつれて分解・希釈されている様子が観測された。次に、

表3 水中の多環芳香族炭化水素水酸化体濃度

Compound	アセチル化**					シリル化***		
	Street A			Street B	Street C	田子の浦	東京湾	南極海
	鹿島港	東京湾	つくば	東京	東京			
1-OHNP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.51	0.05	0.04
2-OHNP	32	15	47	14	12	0.94	0.07	0.05
1,4-NQ	1.6x10 ² *	n.d.	3.8x10 ²	n.d.	n.d.	2.4	0.01	0.08
2,3-diOHNP	6.3	12	n.d.	n.d.	15			
1,5-diOHNP	6.8	12	15	n.d.	n.d.			
1,3-diOHNP	1.1x10 ²	1.0x10 ²	1.4x10 ²	1.0x10 ³	1.1x10 ³ *			
1,6-diOHNP	7.7	17	21	n.d.	n.d.			
2,6-diOHNP	n.d.	n.d.	23	n.d.	11			
2,7-diOHNP	n.d.	n.d.	9.5	n.d.	n.d.			
9-OHPT	16	23	73	n.d.	n.d.	1.4	0.1	0.09
1-OHPR	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
1-OHFR						0.52	0.02	0.03
2-OHFR						0.49	0.02	0.04
1-OHAQ						1.15	0.05	0.07
2-OHAQ						1.7	0.35	0.07
1,8-diOHAQ						5.8	1.92	0.45
2,6-diOHAQ						1.8	0.06	0.12

n.d.; 定量下限以下

*; Unknown peaks originating from other compounds may overlap.

**; アセチル化/吸着剤被覆回転子抽出/熱脱着-GC/MS法

***; TENAX樹脂による固相抽出/in-tubeシリル化/熱脱着-GC/MS法

TENAX樹脂固相抽出/in-tubeシリル化/熱脱着-GC/MS法による、駿河湾田子の浦港の海水試料を測定した。その結果、前法 (アセチル化) では困難であったアントラキノン水酸化体の定量が可能となり、1~10 pptレベルで存在していることが分かった。また、検出限界が1000倍近く改善されたため、サブテーマ(1)で採取した南極海からも0.07~0.45 pptと極低濃度であるが検出された。一方、ナフタレンのジヒドロキシ体は殆ど観測されなかった。これらは、OH-PAHsの濃度や構成種は、試料採取地点の環境や採水時期により大きく異なることを示唆しているものと考えられる。

OH-PAHsの親化合物となるPHAsの環境中濃度についても調べたところ、多摩川河口域堆積物試料中のPAHs濃度は477~2191 (平均:1407±537) ng/gであり、多摩川田園調布堰における水中溶存態のPAHs濃度は15.1~75.6 (平均:38.9±24.0) pptであった。平水時のPAHs濃度 (35.4 ppt) と流量 (14.7 [t/s]) を用いた年間通過量は16.4 [kg/year]であった。また、河口域におけるPAHs濃度は5.9~50.7 (平均:24.8±18.9) pptであり、最も海に近い2地点で検出されたPAHsの値が他の地点と比較して2~8倍以上とかなり高い値となった。両地点は川崎工業地帯付近であることから、工場排水が流入し高濃度になった可能性が考えられた。

(2) 太陽光シミュレーターを用いる光分解過程の解明

太陽光シミュレーターによる各種PAHsの分解速度を測定した結果は、クリセン (11.9分) > ベンゾaピレン (47.7分) > ベンゼピレン (48.1分) > ベンゾaアントラセン (73.4分) > アントラセン (74分) > ピレン (120分) > フルオランセン (159.6分) の順に大きいことが分かった。括弧の中は半減期を表す。また、PAHsの分解速度に対する置換基効果を調べた。アントラセン、1-メチルアントラセン、2-メチルアントラセン、9-メチルアントラセンに光照射を行った結果、分解速度は、9-メチル体 (100%分解45分) > 2-メチル体 > 1-メチル体 > 無置換アントラセン (110分) の順であった。

分解生成物については、太陽光シミュレーターを用いて、アントラセン、ピレン等の分解生成物を同定した。これらの化合物が50%分解した時点で、酸性 (pH<3)、アルカリ性 (pH>10)、

pH無調整の3種の溶液について、ジクロロメタンに抽出し、GC/MSで分析した。アントラセンの光分解生成物のクロマトグラムを図11に示す。マススペクトルを比較することにより、図中の①はアントロン、

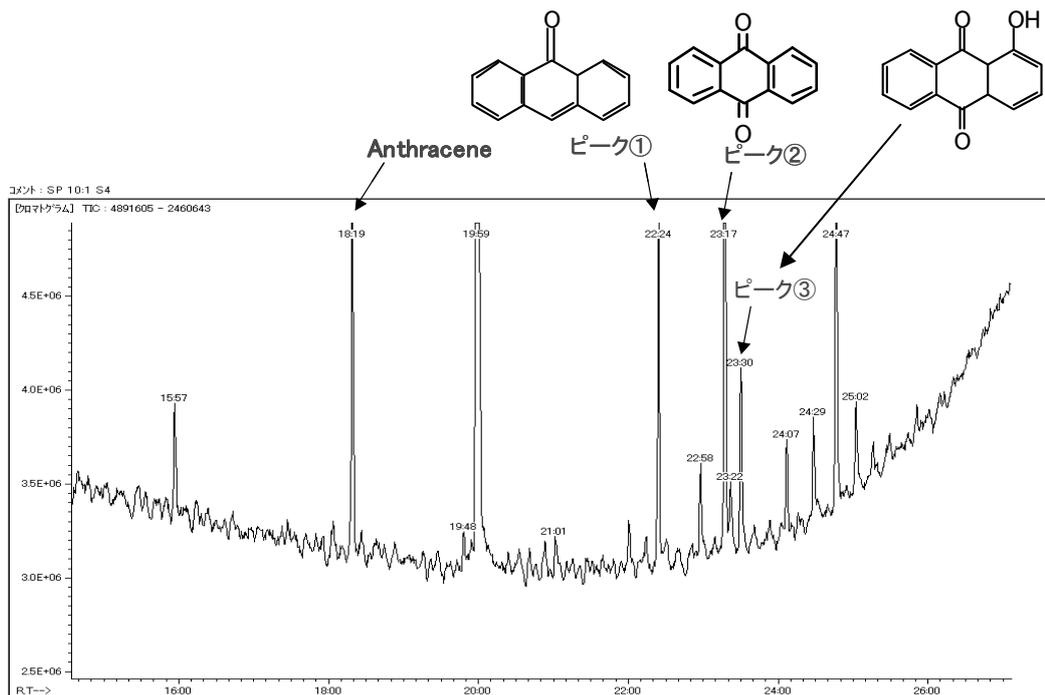


図11 アントラセン光反応生成物のGC/MSクロマトグラム

②はアントラキノン、③は1-ヒドロキシアントラキノンであると同定された。これらの化合物のうち、1-ヒドロキシアントラキノンは比較的強いエストロゲン様活性を示す化合物である。アントラセン自体にはエストロゲン様活性はないが、環境中での変化により、エストロゲン様活性を持つ物質の生成が確認された。

PAHsの光分解反応に対する共存物質の影響を調べた。理論的には、フミン酸のような溶存有機物は、紫外線照射によってスーパーオキシド陰イオンラジカルの発生を促し、これが分解を誘起すると考えられる。このため、まず、フミン酸の影響を調べたが、市販のフミン酸の添加効果はなく、フミン酸濃度が100 ppmまでは分解速度はむしろ遅くなった。次に、金属イオンの分解速度に及ぼす影響を調べた。二価又は三価の鉄イオンを共存させた場合の影響を図

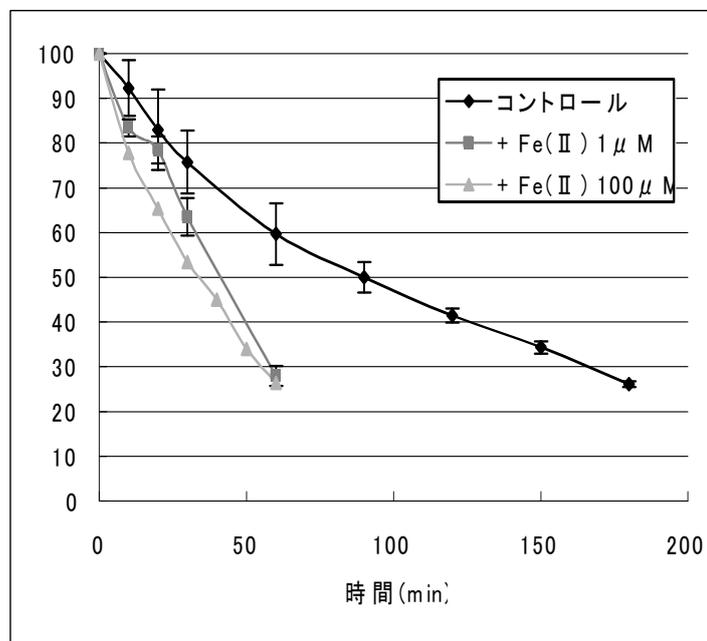


図12 アントラセンの光分解におけるFe(II)の影響

12に示す。濃度として1 μMの濃度でも分解を促進する効果が認められた。濃度を100 μMに増加させるとさらに分解反応は進むが、その割合は小さく、これらの金属は触媒的な働きをしている

ことが推測された。アントラセンの50%を分解するに要した時間は、金属を共存させない場合90分であったが、Fe(II)が1 μM共存

表4 PAHsの光分解に及ぼす金属イオンの影響

金属濃度(μ M)	Control	Fe(II)	Fe(III)	Cu(I)	Cu(II)	Zn(II)	Co(II)
	—	1 100	1 100	1 100	1 100	1 100	1 100
アントラセン	90	41.2 34	48.4 40	40 28.2	55.5 31.9	36.3 33.8	53 34
ピレン	205	— 220	— 212	— 104	— 175	— —	— —

すると41分に短縮された。各種金属イオンの影響を表4にまとめて示す。

(3) エストロジェン様活性（雌性ホルモン様活性）の評価

まず、これまで環境中で検出されている、ベンゼン環が3つ縮合した構造をもつアントラセンの水酸化体の活性を評価することから始めた。その結果を表5に示す。アントラセンの光化学反応生成物の中にはエストロジェン・アゴニスト活性（エストロジェンと同様の活性を持つも

表5 PAHs誘導体のエストロジェン様活性と急性毒

Compound	Agonist EC _{×10} (M)		Antagonist EC ₅₀ (M)		PB test IC ₅₀ (M)
	-S9	+S9	-S9	+S9	
	ANT	-	-	-	
ATQ	-	-	-	-	-
1-hATQ	-	-	-	+++	-
2-hATQ	+++	-	-	-	Weak
1,4-dhATQ	-	-	-	-	Weak
1,5-dhATQ	-	-	-	-	-
1,8-dhATQ	-	-	-	-	-
1,2-dhATQ	+	-	+++	-	Weak
1,2,4-thATQ	-	-	-	-	++
2,6-dhATQ	-	++	-	-	-
2,5-dhBenzoic acid	-	-	-	-	-
2-h-1,4-Naphthoquinone	-	-	-	-	-
Salicylaldehyde	-	-	-	-	-
Anthrarobin	+	-	+++	-	+
2-hDibenzofuran	++	-	-	-	-
2-hFluorene	++	++	-	-	-
2-h-9-Fluorenone	++	-	-	-	Weak
9-Phenanthrol	-	-	-	-	+
17β-Estradiol	+++	-	-	-	-
trans-stilbene	-	+++	-	-	-
4-hTF	-	-	++	+++	-

1.0E-6 (M) > +++
 1.0E-5 (M) > ++ > 1.0E-6 (M)
 1.0E-4 (M) > + > 1.0E-5 (M)
 - > 1.0E-4 (M)

のをアゴニストという)をもつ化合物があることが明らかになった。最も活性の高かった2-ヒドロキシアントラキノン (2-hATQ) は17β-エストラジオールの約8000分の1の活性をもつことが分かつ

た。また、環境エストロゲンとして知られるビスフェノールAやp-ニルフェノールと比較すると、ビスフェノールAの約3倍、p-ニルフェノールの約0.4倍の活性値であった。対象とした化合物をS9で処理したとき、アゴニスト活性が見られたのは二種類の化合物であった。

trans-スチルベンに対し、これらの化合物はそれぞれ、数分の1の活性値を示した。この結果は、アントラセンの光化学反応生成物の中にはS9処理すること（すなわち生体内で代謝されること）によって活性をもつものがあることを意味している。一方、アンタゴニスト（エストロゲン活性を抑制するものをアンタゴニストという）試験の結果から、アントラセンの光化学反応生成物の中で陽性物質が一種類確認さ

れた。その化合物は4-ヒドロキシタモキシフェンの活性に対し、数倍の活性値を示した。この化合物はアゴニスト-S9試験においても活性を示した化合物であった。また、化学物質の急性毒性試験の結果、元のアントラセンには毒性がないが光反応生成物中に毒性を持つものが存在することが分かった。以上の結果から、環境汚染物質のPAHsの一つであるアントラセン、及びアントラセンに光を照射したときに生成する化合物あるいは、その代謝産物がエストロゲン・アゴニスト及びアンタゴニスト活性を有することが明らかとなった。これらの結果は、PAHsの光化学反応が新たな内分泌攪乱物質の起源となることを示唆している。本研究では、誘導体の影響を評価する上でエストロゲン活性に着目しているが、生物に対する化学物質の影響は未だ不明な点が多く、このようなデータの蓄積は今後、更に必要なものとなる。

次に、ベンゼン環が2つ縮合したナフタレンの水酸化体の活性を評価した。その結果を表6に示す。11種類の化合物のうち、エストロゲン・アゴニスト-S9試験において5物質が、また+S9試験において4物質で活性が確認された。+S9試験で活性を示した化合物は、-S9試験においても活性が確認された化合物であった。この結果は、これらの化合物が代謝されにくい化合物であるか、または代謝されたときに新たにエストロゲン様活性を示す化合物に変化していることを示唆している。ナフタレンの水酸化体の中にはアントラセン水酸化体の中で最も活性の高かった2-ヒドロキシアントラキノンの約1/4の活性を示す化合物が見られた。ナフタレン水酸化体は環境中濃度が高い場合が多いことから、エストロゲン様活性への寄与率を把握していく必要がある。

(4) 海水試料の分析とエストロゲン様活性の総合評価

種々の起源の海水試料のエストロゲン様活性を評価するため、駿河湾の5地点から海水を採取した。採取地点を図3に示してある。採取した海水中の対象化学物質の濃度を測定した結果、16種類の対象化学物質が検出された（表7）。これらの化学物質は、ng/Lからpg/Lのオーダーで検出された。多環芳香族炭化水素やその誘導体としては、例えば、ナフタレン (8.1~244 ng/L)や2-ナフトール (<0.7~54.6 ng/L)、1,4-ジヒドロキシナフタレン (<0.8~38.0 ng/L)が海水試料から検出され、特にstation 4におけるそれらの濃度は他の試料採取地点と比較して高かった。同様に、9-フルオレ

表6 ナフタレン水酸化体のエストロゲン様

Compound	-S9 test	+S9 test
NP	NA*	NA
1-OHNP	4.00E-05	5.00E-05
2-OHNP	9.00E-06	2.00E-05
1,3-diOHNP	NA	NA
1,4-diOHNP	NA	NA
1,5-diOHNP	NA	NA
1,6-diOHNP	NA	NA
2,3-diOHNP	2.00E-04	7.00E-03
2,6-diOHNP	NA	NA
2,7-diOHNP	5.00E-04	1.00E-02
6-Br-2-OHNP	4.00E-06	NA
17β-Estradiol**	1.07E-10	-
<i>trans</i> -stilbene**	-	1.78E-06

* NA: non-active

** positive control

表7 駿河湾で採取した海水中の化学物質の濃度 (ng/L)

Compound	Sampling station				
	1	2	3	4	5
1 Naphthalene (NAP)	21.8 ± 12.3	10.0 ± 0.6	12.4 ± 2.9	244 ± 14.7	8.1 ± 1.6
2 Fluorene (FLU)	8.5 ± 0.8	2.3 ± 0.1	1.8 ± 0.2	47.8 ± 3.8	1.8 ± 0.1
3 9-Fluorenone (9-FLUO)	9.3 ± 0.3	3.9 ± 0.2	1.6 ± 0.3	53.7 ± 11.3	1.2 ± 0.1
4 Anthracene (ANT)	<0.3	<0.3	<0.3	32.0 ± 2.6	<0.3
5 Anthraquinone (ATQ)	4.7 ± 0.5	7.6 ± 0.7	4.1 ± 0.3	2050 ± 79.4	<3
6 Pyrene (PYR)	2.2 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.2 ± 0.1	52.3 ± 2.4	1.0 ± 0.1
7 2-Naphthol (2-hNAP)	<0.7	<0.7	<0.7	54.6 ± 3.4	<0.7
8 Nonylphenol (NP)	36.0 ± 5.2	35.4 ± 1.9	113 ± 21.5	276 ± 110	28.2 ± 4.7
9 Octylphenol (OP)	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8
10 1,4-dhNaphthalene (1,4-dhNAP)	<0.8	<0.8	<0.8	38.0 ± 4.9	<0.8
11 6-Bromo-2-naphthol (6-Br-2-hNAP)	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6
12 <i>p</i> -Cumylphenol (CP)	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.04	3.2 ± 0.3	0.1 ± 0.01
13 2-Hydroxydibenzofuran (2-hDBF)	0.4 ± 0.1	<0.3	0.4 ± 0.1	11.2 ± 0.1	0.5 ± 0.1
14 2-Hydroxyfluorene (2-hFLU)	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4
15 2-Hydroxy-9-fluorenone (2-h-9-FLUO)	<0.7	2.2 ± 0.1	<0.7	3.7 ± 0.2	<0.7
16 Bisphenol A (BPA)	6.1 ± 0.4	4.0 ± 0.7	10.0 ± 0.5	1070 ± 52.6	3.6 ± 0.02
17 1-HydroxyATQ (1-hATQ)	<2	10.4 ± 2.5	<2	48.6 ± 3.4	<2
18 2-HydroxyATQ (2-hATQ)	<4	<4	<4	14.0 ± 0.7	<4
19 1,4-DihydroxyATQ (1,4-dhATQ)	<2	<2	<2	<2	<2
20 1,5-DihydroxyATQ (1,5-dhATQ)	<2	<2	<2	<2	<2
21 1,8-DihydroxyATQ (1,8-dhATQ)	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8
22 Estrone (E1)	<1	9.2 ± 1.5	1.4 ± 0.1	<1	<1
23 17β-Estradiol (E2)	<1	<1	<1	<1	<1
24 2,6-DihydroxyATQ (2,6-dhATQ)	<2	<2	<2	<2	<2
25 17α-Ethinylestradiol (EE2)	<3	<3	<3	<3	<3

ノン (1.2~53.7 ng/L)とその水酸化された構造を持つ2-ヒドロキシ-9-フルオレノン (<0.7~3.7 ng/L)が検出された。また、アントラセン (<0.3~32.0 ng/L)とアントラセンの光化学反応によって生成する誘導体であるアントラキノン (<3~2050 ng/L)、1-ヒドロキシアントラキノン (<2~48.6 ng/L)、2-ヒドロキシアントラキノン (<4~14.0 ng/L)も検出され、これらの化合物もstation 4において濃度が高かった。ナフタレン、9-フルオレノン、アントラセンなどの親化合物はエストロゲン様活性を示さなかったが、水酸基をもつことによってエストロゲン様活性を示す化合物が海水試料中に存在していた。また、日本の中でも製紙業が盛んな地域の一つであるStation 4の海水試料からエストロンを除く対象化学物質が高濃度で検出された。

次に、それぞれの対象化学物質のエストロゲン様活性への寄与率を、個々の化合物のエストロゲン様活性と化学分析の結果から見積もった、各試料採取地点のエストロゲン様活性への化学物質の寄与を図13に示した。その結果、ステロイドホルモンであるエストロンは下水処理場付近の試料採取地点 (stations 2および3) において最も環境エストロゲンへの寄与率が高い化合物であった。そのstations 2および3の海水中において2番目に寄与率が高かったエストロゲン様活性物質はノニルフェノールであり、次いでビスフェノールAであった。また、図13に示したように、主としてノニルフェノールが2つの漁港 (stations 1および5) におけるエストロゲン様活性に寄与していた。一方で、ビスフェノールAはstation 4のエストロゲン様活性に主として寄与していた。この活性は、多くの製紙工場が存在するstation 4周辺の工業活動の影響によるものであると考えられた。本結果は、海洋環境、特に古紙再生工場や下水処理場付近を注意深く監視することが、環境学、環境毒性学的に重要であることを示した。

海水試料のエストロゲン様活性をバイオアッセイの結果と化学分析から見積もった結果の両

方で評価した (図14)。エストロジェン様活性は、-S9試験については17β-エストラジオール当量濃度 (17β-estradiol equivalent concentrations, EEQ)、+S9試験についてはtrans-スチルベン当量濃度 (trans-stilbene equivalent concentrations, SEQ)として評価した。化学分析から見積もったエストロジェン様活性の値は、それぞれの化合物の濃度とエストロジェン様活性から計算した。最も強いエストロジェン様活性は下水処理場付近の試料採取地点 (station 2) で観察された

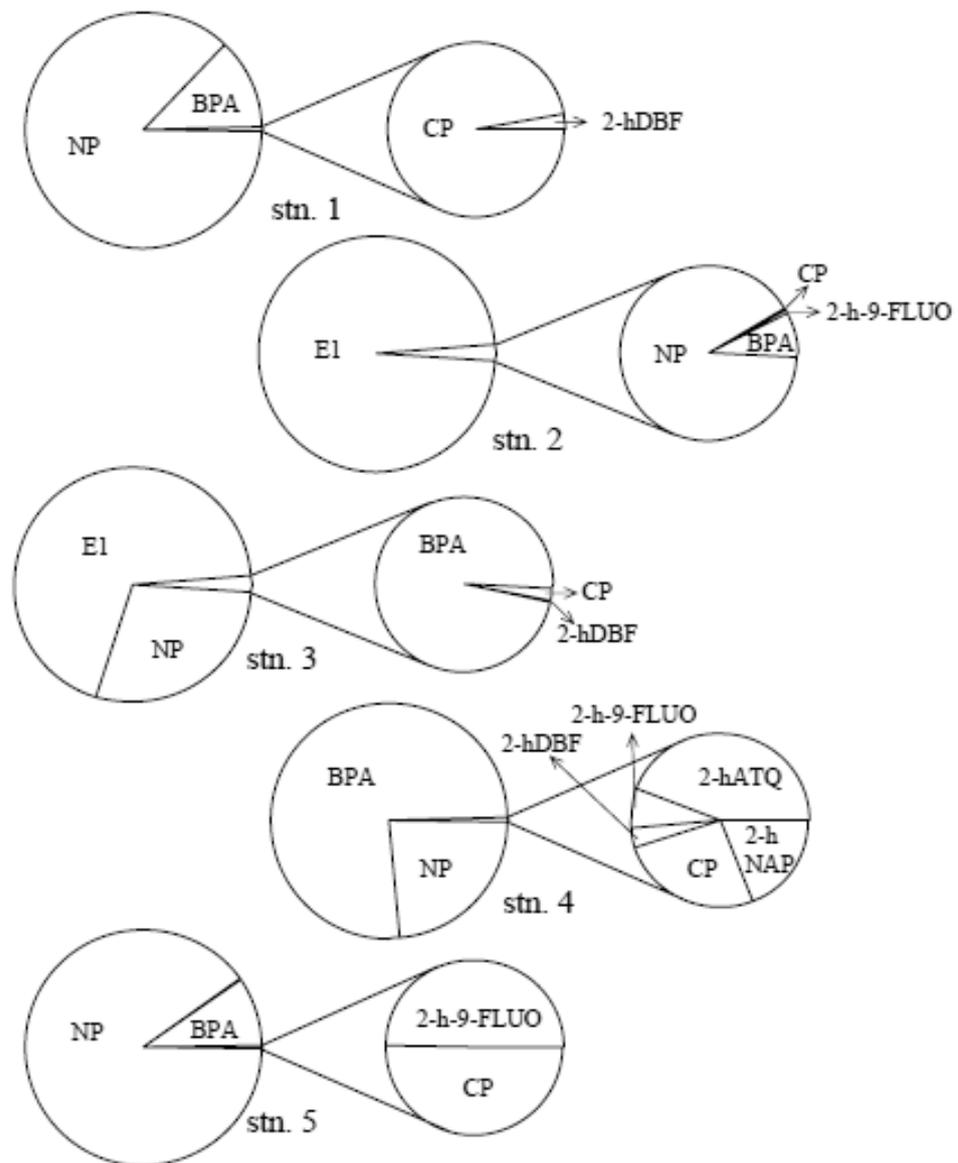


図13. 対象化学物質のエストロジェン様活性への寄与率
 NP = nonylphenol; BPA = bisphenol A; CP = Cumylphenol; 2-hDBF = 2-hydroxydibenzofuran; E1 = Estrone; 2-h-9-FLUO = 2-hydroxy-9-fluorenone; 2-hATQ = 2-hydroxyanthraquinone; 2-hNAP = 2-Naphthol.

(図14)。また、その他の地点においては、バイオアッセイによってエストロジェン様活性が観察されなかった。-S9試験では、全ての試料採取地点において、化学分析の結果から算出したエストロジェン様活性の値が、バイオアッセイで得られた活性よりも高かった。その理由として、廃水の中には多くの化学物質が含まれているため、化学分析によって得られたよく知られているエストロジェン様活性物質のみの値を足し合わせただけの結果では、バイオアッセイの結果とに差が生じるものと考えられる。この化学分析とバイオアッセイの結果に差が生じた理由は明らかではないが、station 2のサンプル中にはエストロジェンアンタゴニストのようなエストロジェン様活

性を抑える作用をもつ化学物質が存在していた可能性がある。

化学分析とバイオアッセイの結果から、ラット肝臓S9を用いた場合のエストロゲン様活性についても評価した(図14(b))。

化学分析では、+S9試験においてエストロゲン様活性を示したピレンと2-ナフトールが海水試料から検出された(表7)。バイオアッセイにおいて、station 2で採取した海水試料から最も高いSEQが示され、その結果は化学分析の結果から見積もった活性と比較して約5桁高い値であった(図14)。

バイオアッセイによって示されたこの活性は、station 2

の海水中にはS9処理することによって、数多くのまたは強いエストロゲン様活性を示す物質が存在していたことを示唆している。もう一つの可能性として、海水中のエストロンなどのステロイドホルモンが海水中の有機物などのマトリックスによって保護され、S9処理によって分解されなかった可能性も考えられる。

最後に、本研究において、環境エストロゲンに対する水酸化多環芳香族炭化水素の寄与率は低かったが、石油流出事故などにより、多環芳香族炭化水素が高濃度で環境中に放出された場合、太陽光照射や生物の活動によって多環芳香族炭化水素の水酸化体が生成する可能性があり、今後このような研究を進めていくことが必要であると思われる。また、下水処理場付近における海水試料のエストロゲン様活性が-S9試験よりも+S9試験で高かった事実をふまえ、今後代謝産物

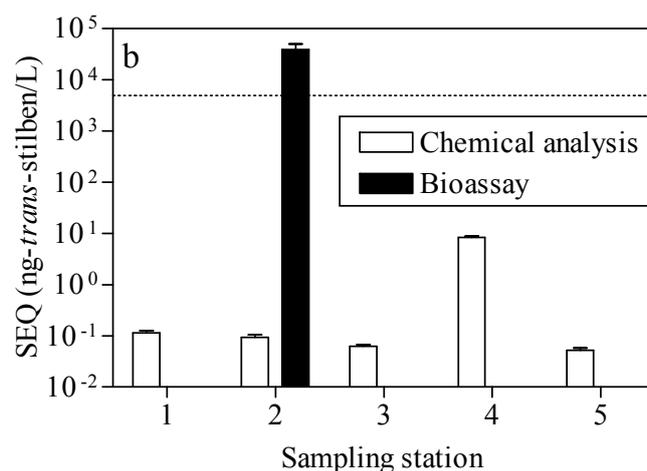
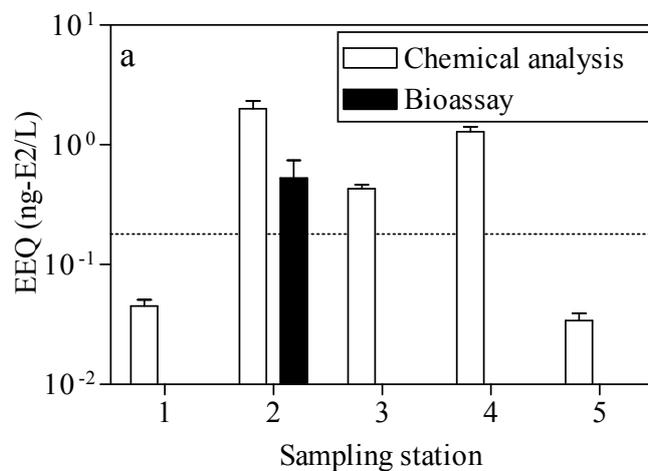


図14 化学分析から見積もったエストロゲン様活性とバイオアッセイの結果

(a)は-S9試験の結果で17β-estradiol equivalent concentrationsで示した。(b)は+S9試験の結果でtrans-stilbene equivalent concentrationsで示した。点線は、バ

も考慮したさらなる研究が必要であると思われる。

5. 本研究により得られた成果

多環芳香族炭化水素（PAHs）の水酸化体の極微量分析法を開発し、従来の方法に比べて約1000倍の高感度化を実現した。これにより、外洋海域の極低濃度の水酸化体を定量することが可能となった。PAHsの海水中における分解速度、共存物質の影響を明らかにした。また、光分解によって水酸化体が生成していることを実験により実証した。エストロゲン活性に関しては、アントラセン系及びナフタレン系の水酸化体の活性を明らかにした。ナフタレン、9-フルオレノン、アントラセンなどの親化合物はエストロゲン様活性を示さなかったが、水酸基をもつことによってエストロゲン様活性を示すことを示した。これと上記の光分解の結果水酸化体が生成することをあわせると、元々のエストロゲン様活性を持たなかった海水が変質し、新たにエストロゲン様活性を持つようになると考えられた。これらの開発した分析方法及びエストロゲン活性測定法を、PAH水酸化体のエストロゲン様活性能と、25種類の化学物質の海水中における濃度の測定とを総合化することにより、海水中のエストロゲン様活性に対するそれぞれの化学物質の寄与率についての検討を行った。その結果、25種類の対象化学物質中、16種類の化学物質が海水試料から検出され、駿河湾の海水中の主なエストロゲン様活性物質は、エストロン（ ≤ 9.2 ng/L）、ビスフェノールA（ ≤ 1070 ng/L）およびノニルフェノール（ ≤ 276 ng/L）であり、これまで未解明であったPAH水酸化体の海洋環境における有害性の総体に対する寄与を評価した。駿河湾海水では、PAH水酸化体のエストロゲン様活性全体に対する寄与率は低かったが、石油流出事故などにより、PAHsが高濃度で環境中に放出された場合、太陽光照射や生物の活動によって多環芳香族炭化水素の水酸化体が生成する可能性があり、今後もより多くの海域を対象として、このような研究を進めていくことが必要であると考えられた。今後、本研究で確立された分析方法を、広範な実環境に適用することにより、PAH及びその水酸化体の海洋中での変質・分解過程の解明や国際的なモニタリング手法の確立への貢献が期待できる。

6. 引用文献

- 1) C. A. Menzie, B. B. Potocki, J. Santodonato, "Exposure to carcinogenic PAHs in the environment", *Environ. Sci. Technol.*, 26, 1278-1284, (1992).
- 2) J.-J. Yao, Z.-H. Huang, S. J. Masten, "The ozonation of benz[a]anthracene: Pathway and product identification", *Wat. Res.*, 32, 3235-3244, (1998).

7. 国際共同研究等の状況

有機スズなどの船底塗料関連の国際シンポジウム（International Symposium on Antifouling Paint and Marine Environment, Tokyo, 2004）の実行委員として参加者と情報交換を行った。また、日本造船協会・国土交通省・海上技術安全研究所などから構成される委員会（RR-E102 TBT分科会）メンバーとして、国際海事機構（IMO）へわが国から提出する船底塗料の分析方法の審議に参加した。多環芳香族炭化水素及びその水酸化体に関しては、金沢大学COEと環日本海における環境動態の研究を進めている。本プロジェクトに従事していたR. B. Rajendran氏がインドに帰国し、国連大学のPOPsプロジェクトでインドの代表的な研究者として活躍中である。インドでもPOPsの重要

性が認識され始めており、R. B. Rajendran氏と情報交換を行っている。今後、共同研究のファンドを申請する予定であり、国際的な共同研究へ発展させていきたい。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- ① R. Kurihara, F. Shiraishi, N. Tanaka, and S. Hashimoto: Environ. Toxicol. Chem., 24, 1984-1993 (2005) “Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastal Japanese waters.”
- ② K. Fujiwara, H. Kumata, N. Kando, E. Sakuma, M. Aihara, Y. MOrita, T. Miyakawa, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 86, 337-346 (2006)
“Flow injection analysis to measure the production ability of superoxide with chemiluminescence detection in natural water.”

<その他誌上発表（査読なし）>

なし

(2) 口頭発表（学会）

- ① R. Kurihara, F. Shiraishi, N. Tanaka, S. Hashimoto: SETAC 24rd Annual Meeting in North America Austin, Texas, USA, Nov., 2003
“Toxic polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal areas of Japan”
- ② S. Hashimoto, E. Watanabe, Y. Ueda, R. Kurihara, K. Fujii, A. Kakuno, F. Shiraishi: SETAC 24rd Annual Meeting in North America Austin, Texas, USA, Nov., 2003
“Evaluation of estrogenic activities in contaminated bay sediments”
- ③ 上田泰寛, 渡辺絵美, 栗原龍, 白石不二雄, 藤井一則, 門上希和夫, 橋本伸哉: 日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会, 仙台, 2003年12月
“バイオアッセイと化学分析による底質の雌性ホルモン様活性評価”
- ④ 栗原龍, 白石不二雄, 田中憲穂, 橋本伸哉: 日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会, 仙台, 2003年12月
“エストロゲン活性をもつアントラセン誘導体の日本沿岸域における分布”
- ⑤ R. Babu Rajendran, H. Tao: International Symposium on Antifouling Paint and Marine Environment, Tokyo, 2004
“Occurrence of Organotin Compounds in Seawaters around Japan and East China Sea”
- ⑥ 伊藤信靖, 田尾博明, 指宿堯嗣: 第65回分析化学討論会, 沖縄, 2004.5.16
“スターバー抽出-熱脱着-GC/MS法による海水中PAH水酸化体の定量”
- ⑦ 伊藤信靖, 田尾博明, 指宿堯嗣: 第13回環境化学討論会, 静岡, 2004.7.7
“熱脱着-GC/MS法による海水中に含まれる多環芳香族炭化水素水酸化体の高感度分析”
- ⑧ R. Kurihara, Y. Ueda, F. Shiraishi, N. Tanaka, S. Hashimoto, SETAC 25rd Annual Meeting in North America (Portland, Oregon, USA, Nov. 14-18, 2004)
“Evaluation of the estrogenic activity of seawater from the coastal area of Suruga Bay, Japan”
- ⑨ R. Kurihara, Y. Ueda, F. Shiraishi, N. Tanaka, S. Hashimoto: SETAC 25th Annual Meeting in North America Portland, Oregon, USA, Nov., 2004

“Evaluation of the estrogenic activity of seawater from the coastal area of Suruga Bay, Japan”

- ⑩ 藤原祺多夫, 石毛優子, 熊田英峰, 伊藤誠治, 古野正浩: 第66回日本分析化学討論会, 2005.5, 北見

“多環式芳香族炭化水素の太陽光分解とその生成物について”

- ⑪ 土田信枝, 熊田英峰, 本田祐介, 藤原祺多夫: 第66回日本分析化学討論会, 2005.5, 北見
“多環芳香族炭化水素の都市河川水中の濃度と河口域における除去過程”

- ⑫ N. Tsuchida, Y. Honda, H. Kumata, K. Fujiwara: American Society of Limnology and Oceanography Summer Meeting, 2005.6, Santiago de Compostela, Spain.

“Distribution and their removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in estuary region”

- ⑬ K. Fujiwara, Y. Ishige, S. Taigo, H. Kumata: American Society of Limnology and Oceanography Summer Meeting, 2005.6, Santiago de Compostela, Spain.

“Solar-induced decomposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic media”

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

なし

(5) マスコミ等への公表・報道等

なし

9. 成果の政策的な寄与・貢献について

日本造船協会・国土交通省・海上技術安全研究所などから構成される委員会（RR-E102 TBT分科会）メンバーとして、国際海事機構（IMO）へわが国から提出する船底塗料の分析方法の審議に参加した。今後、TBT全廃が地球規模の海洋汚染に及ぼす影響のモニタリングに貢献するよう努める。また、多環芳香族炭化水素及びその水酸化体の極微量分析法とエストロゲン様活性評価法の標準化により国際的に共通の尺度を持った有害性評価手法の提言を行っていく。環境動態に関する科学的な情報を積み上げることにより、POPs全体において、どの程度の優先度をもって取り組むべきかを明らかにしていく。