

D-2 有害化学物質による地球規模の海洋汚染評価手法の構築に関する研究

(2) 環境ホルモン・重金属等による地球規模の海洋汚染観測システムの構築に関する研究

独立行政法人産業技術総合研究所

環境管理研究部門 計測技術研究グループ 田尾博明・中里哲也・津野宏・R.Babu Rajendran
名古屋大学大学院 工学研究科 原口紘丞・伊藤彰英
静岡県立大学大学院 生活健康科学研究科 橋本伸哉

平成12～14年度合計予算額 50,181千円

(うち、平成14年度予算額 16,604千円)

〔要旨〕地球規模で進行する内分泌攪乱化学物質や重金属類による海洋汚染の動態を把握し、その動態を解明するためには、国際航路を運航している商船を利用した海洋観測システムを構築することが有効である。このため、商船に搭載可能な自動クリーン試料採水装置を開発した。また、採取海水量が限られることから、少量試料から可能な限り多様な情報を抽出するための高感度多成分分析方法を開発した。この結果、海水中の35元素を定量可能とし、ppqレベルの9種類の有機スズ化合物を定量可能とした。また、雌性ホルモン様活性物質のバイオアッセイ法を開発した。開発した採水装置を、日本ーペルシャ湾間を航行するタンカー並びに日本ーオーストラリア間を航行する石炭コンテナ船に搭載し、採水した海水試料を分析した結果、これらの海域の元素濃度、有機スズ濃度、雌性ホルモン様活性を測定することが可能となった。各海域毎の地理的、気候的な特性に応じて元素濃度が変動していること、また幾つかの微量元素濃度は、日本近海やペルシャ湾内で高いこと、北半球で高く南半球では低いことなど、人為的な活動の影響が地球規模でも現れていることを明らかにした。有機スズ化合物に関しても、TBTは日本近海やマラッカ海峡で濃度が高いこと、南半球では北半球に比べて濃度が低いこと、閉鎖性水域でありかつタンカー通行量の多いペルシャ湾ではTBT濃度は予想に反して低い一方、TBTの分解生成物であるMBTや無機のスズが非常に高くなっていることなど、外洋域の汚染実態を初めて明らかにした。すなわち、TBTの海洋環境中での分解速度には日射量が非常に大きい影響を及ぼすこと、スズの海洋化学的な挙動に関しては、人為的な影響が既に自然の循環を越えていることなどを明らかにした。雌性ホルモン様活性に関しては、太平洋中部海域において、そのものは活性を有しないが、体内に取り込まれて代謝されることにより活性を示す物質の存在が示唆された。これに関しては再調査と、その実体解明が今後の課題として残された。

〔キーワード〕環境ホルモン、重金属、有機スズ、地球規模海洋汚染、商船利用観測システム

1. はじめに

産業化に伴って利用される重金属類や化学物質の種類は世界各地で増加しており、また、既に日本では使われていない農薬や有機スズ化合物なども発展途上国においては未だに使用されており、それらが河川や大気を経由して最終的に海洋に流入し、海流等の働きにより地球規模で拡散しているものと考えられている。このため、内分泌攪乱化学物質や重金属類による海洋生態系へ

の影響に関心がもたれているが、これまでの調査は主に沿岸域に限られているため、或いは外洋域に関しても大学などの海洋調査船を使って実施されているが、採取できる海域や時期が限定されているため、地球規模での海洋汚染の実態を把握することは困難である。時空間的に密な観測を行い、有害化学物質による地球規模での海洋汚染の実態を解明するためには、新たな海洋観測システムを構築することが必要である。

2. 研究目的

地球規模で進行する内分泌攪乱化学物質や重金属類による海洋汚染の動態を把握し、その動態を解明するための新しい海洋観測システムとして、定期商船を利用する海洋観測システムを開発し、観測を通して全球的な海洋汚染情報を取得することが本研究の目的である。このために必要な、商船に搭載可能な自動クリーン試料採水装置及び試料保存方法を検討し、採取海水から可能な限り多様な情報を抽出するため高感度多成分分析方法及びデータ解析法を確立する。また、開発したシステムを実際に商船に搭載し、地球規模の海洋観測における有用性を評価する。

3. 研究方法

初年度は、海水を採取し保存するための自動採水システムの開発を行った。また、限られた試料で多数の化学物質の分析を可能とする微量試料分析法を開発した。自動採水システムには溶存態と懸濁態を分別するため、ろ過システムを組み込んだ。また、採取海水の変質を抑えるため、冷蔵保存可能とした。分析法としては、キレート濃縮/ICP-MS法（重金属類）、バイオアッセイ法（雌性ホルモン様活性物質）、GC/ICP-MS法（有機スズ化合物）を用い、試料量が従来の1/3～1/5以下で分析が可能となるよう試料前処理法及び分析感度の向上を図った。開発した自動採水システムを日本～ペルシャ湾を航海するタンカーに搭載し、試運転及び予備観測を実施した。2、3年目は、予備観測で明かとなった自動採水システムの問題点を改良するとともに、日本～ペルシャ湾に加えて、日本～豪州間を航海する石炭運搬船に搭載し、これらの海域における有機スズ化合物、重金属類、雌性ホルモン様活性を測定し、海域ごとの特徴を明かにした。

4. 結果・考察

(1) 自動採水システムの開発

重金属類や有機スズ化合物は、吸着体による海水からの直接濃縮や回収が困難であるため、海水そのものを採取し、実験室に持ち帰る必要がある。通常、航海は数十日に渡ることや自動採水器を設置するエンジン室の気温は40℃近くになることから、採取海水の変質をできる限り抑えるため、冷蔵機能を備えた採水システムが不可欠である。また、環境中での動態を解明するためには、溶存態と懸濁態を分別して定量することが重要であるので、ろ過システムを組み込む必要がある。なお、重金属類は酸を添加しないと、低温保存しても水酸化物の沈殿や器壁への吸着による損失が避けられないため、採水容器に予め酸を添加しておくことにより、これらの損失を防ぐこととした。開発した自動採水システムの概略図を図1に示す。本システムは、12本の採水容器に任意の時間に海水をろ過採取することが可能である。

(2) 分析方法の開発

① キレート樹脂濃縮/ICP-MS法による海水中微量金属の多元素定量法の開発

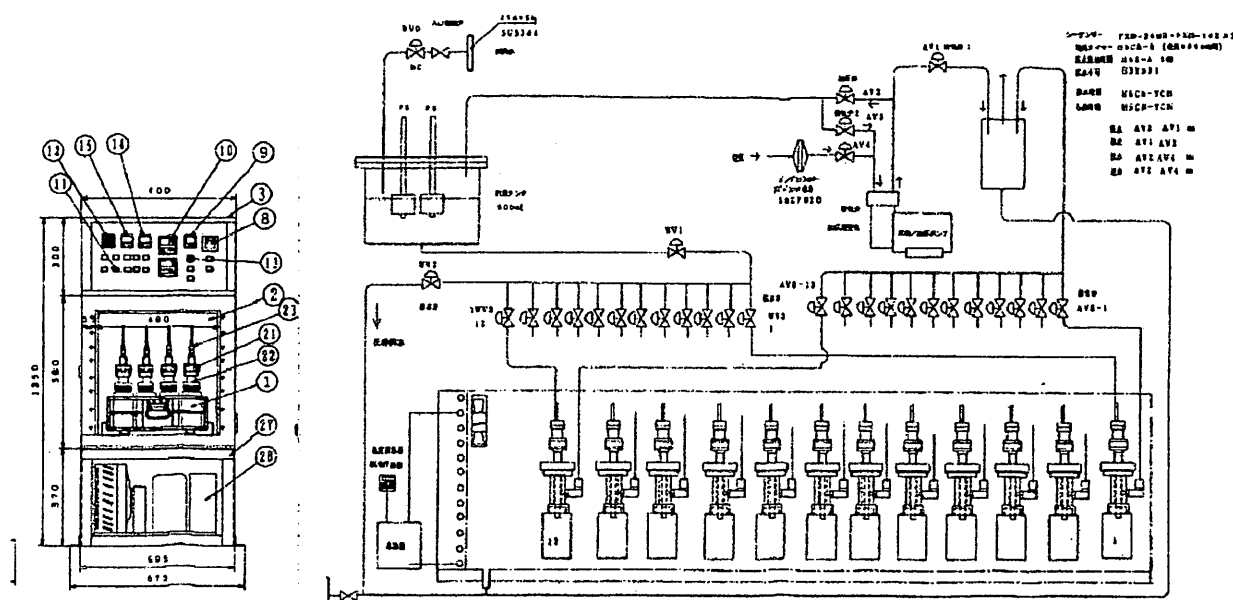
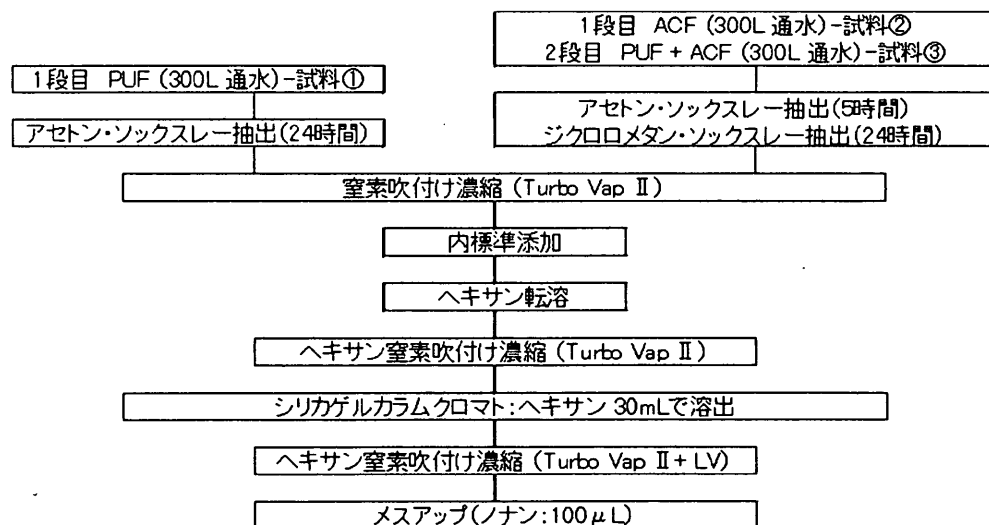


図1 自動海水採取装置

海水の主成分は、海水を希釈後、誘導結合プラズマ発光法(ICP-AES法)により分析することができるが、重金属類は濃度が極めて低いため、分離濃縮法と高感度分析法を併用する必要がある。本研究では、Chelex-100(Bio-Rad Laboratories製)を用いるキレート樹脂濃縮法により、海水中の微量重金属元素の多元素濃縮と海水の主成分元素の除去を行った後に、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS

法)で海水中の微量重金属元素を同時に定量する方法を開発した。本法を用いて海水試料150 mlを5 mlに濃縮(30倍)して分析を行うことにより、30元素の微量重金属元素の定量が可能になった。本法の信頼性は、海水標準物質(CASS-3, NRC)を



試料(①～③)を処理後等量混合し、雌性ホルモン様活性測定試験に供した。

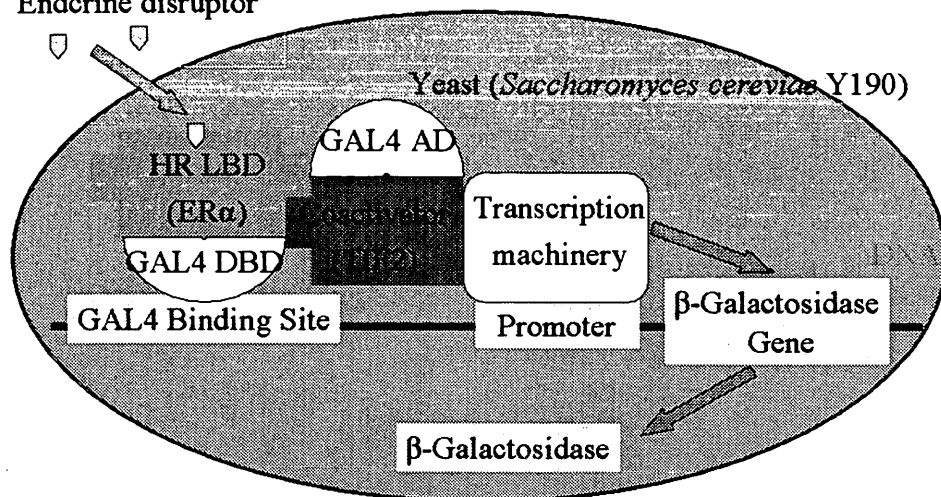
図2 試料処理方法

用いて確認した。認証値が与えられている元素の分析値はほとんど認証値の範囲内で一致しており、本法による分析値の信頼性が確認された。この結果、ICP-AESで測定可能な主成分元素とあわせて35元素の定量が可能になった。

②GC/ICP-MS法による
有機スズ化合物の定
量

本法は、有機スズ化
合物をテトラエチル
ホウ酸ナトリウムに
よりエチル化し、GC
で分離後、ICP-MSで検
出する方法である。筆
者らによって開発さ
れ標準化情報¹⁾に記載
されているため、ここ
では詳細は省略する
が、要点だけを記述す
ると、海水試料1 Lを
用いて0.1 ppq (10^{-12}
g/L)の検出限界が得られる。

E2 or
Endocrine disruptor



GAL4 AD : GAL4 Activation Domain
GAL4 DBD : GAL4 DNA Binding Domain
HR LBD : Hormone Receptor Ligand Binding Domain

図3 酵母 two-hybrid システムの概念図

③雌性ホルモン様活性物質測定法の開発

雌性ホルモン様活性の測定には大量の試料水が必要であり、海水300 Lをポリウレタンフォーム (PUF) 及び活性炭素繊維フィルター (ACF) に通水させて、海水に含まれる雌性ホルモン様活性物質を吸着濃縮させた。測定には、各吸着体のソックスレー抽出液を等量混合したものを、シリカゲルカラムクロマトによりクリーンアップしたものを供した。試料前処理法の概略を図2に示す。雌性ホルモン様活性の測定は、酵母Y190株にヒトエストロゲンレセプター遺伝子α、コアクチベーターの発現プラスミド、及びβ-ガラクトシダーゼ発現系レポータープラスミドを酵母 Two-Hybrid System法により導入した酵母 (J. Nishikawa²⁾) を用い、96穴プレート培養法、及び化学発光レポーター遺伝子測定法 (F. Shiraishi³⁾) で測定した。すなわち、この分析系では雌性ホルモン様物質が存在すると、ヒトエストロゲンレセプターと結合し、これがDNAに作用して最終的にβ-ガラクトシダーゼが生成する (図3)。β-ガラクトシダーゼは特定の基質を作用させると化学発光を起こし、高感度検出が可能となる仕組みである。また、測定はクリーンアップ液をラット肝S9で処理した+S9試験及び-S9試験を行った。ここで、-S9試験は試験化合物そのものの活性を現し、+S9試験は試験化合物の代謝産物が活性を持つことを意味している。

(3) 重金属類の濃度分布

①日本ーペルシャ湾航路海水中的元素濃度分布

日本ーペルシャ湾航路上における全42点の海水試料をICP-AESで測定して得られた主成分元素濃度分布を図4に示す。全測定点の平均濃度は、Na 9970 mg/l, Mg 1260 mg/l, Ca 478 mg/l, Sr 8.00 mg/lであった。K濃度はICP-AES測定において定量下限付近のデータが多く信頼性が低いため、ここでは除外した。参考として北太平洋のデータと比較すると、北太平洋における平均濃度は、Na 10737 mg/l, Mg 1281 mg/l, Ca 412 mg/l, Sr 7.80 mg/lであり、西太平洋からインド洋にかけての東経140度～ 東経 60度の海域においては、NaとCaを除いてほぼ北太平洋の平均値付近の値を示

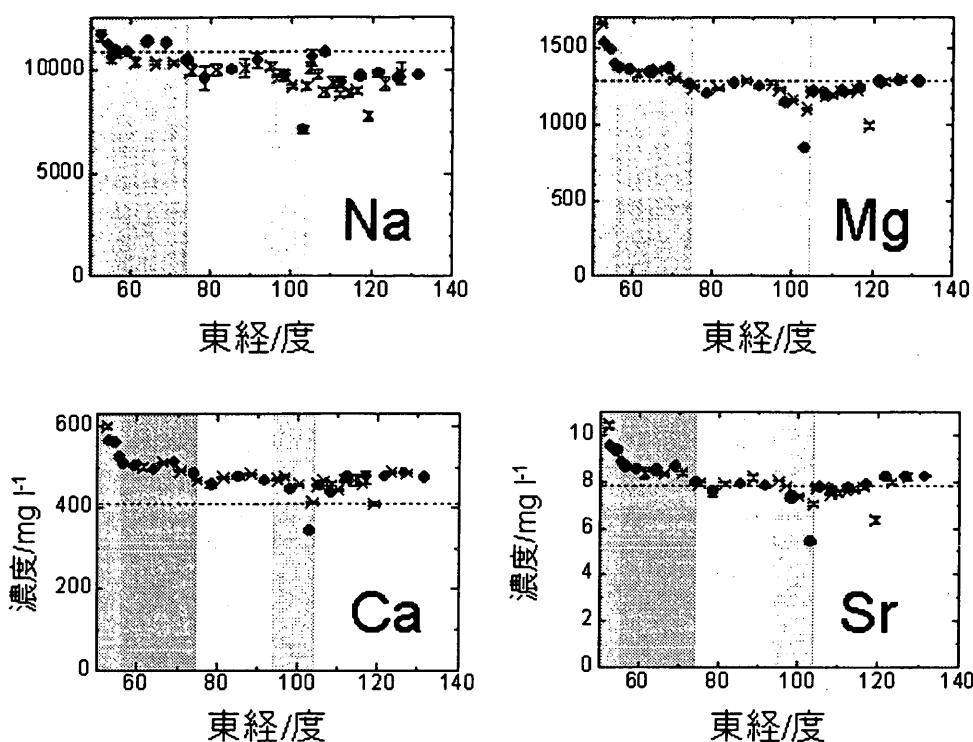


図4 日本-ペルシャ湾航路海水中の主成分元素の濃度分布

●：往路、×：復路、---：北太平洋における定量値【野崎義行
：地球化学, 26, 24 (1992).】

した。Naは東シナ海、南シナ海、マラッカ海峡、ベンガル海でやや低い濃度を示した。一方、Caは北太平洋の濃度よりも10%程度高い値であった。この原因は明らかではないが、北太平洋と本研究のタンカー航路では、水生生物、特にサンゴ礁などCaを多く含む生物活動量が異なり、これら生物が関与する平衡系がCa濃度に影響した可能性が考えられる。各海域の特徴について考察すると、Na, Mg, Ca, Srはマラッカ海峡付近（東経101度, 109度）では、他の海域にくらべて、10～20%程度低い濃度を示した。この海域は、シンガポール、マレーシアとインドネシアに挟まれて、陸に近い海域である。したがって、陸水の混入のため、Na, Mg, Ca, Srの濃度が低くなったものと考えられる。逆に、ペルシャ湾内（東経60度以下）では、Na, Mg, Ca, Srの濃度は全地点の平均値に比べて10～30%程度高い値を示した。この海域では雨が少なく、日射量が多いため、表層海水の蒸発が活発であり、主成分元素濃度が高くなったと考えられる。

日本-ペルシャ湾航路で採水された全42点の海水試料をキレート樹脂濃縮/ICP-MSで測定した結果、 $\mu\text{g/l}$ ～sub- $\mu\text{g/l}$ レベルの約30元素の定量値を得ることができた。分析精度はほとんどの元素について相対標準偏差（RSD）10%以内であり、広域海水中元素濃度分布を比較・検討するには十分であった。図5には、特徴的な分布を示した元素として、Cd, Pbの濃度分布を示す。Cdの濃度分布は、ベンガル海以東では、往路、復路ともに3-10 ng/lであったが、ペルシャ湾内では30-70 ng/lであり、他の外洋域に比べて5-10倍程度高い濃度分布を示した。Mn, Coもほぼ同様の分布傾向を示した。ペルシャ湾内においてこれらの元素が高濃度を示すことは、同湾が陸に近く閉鎖性

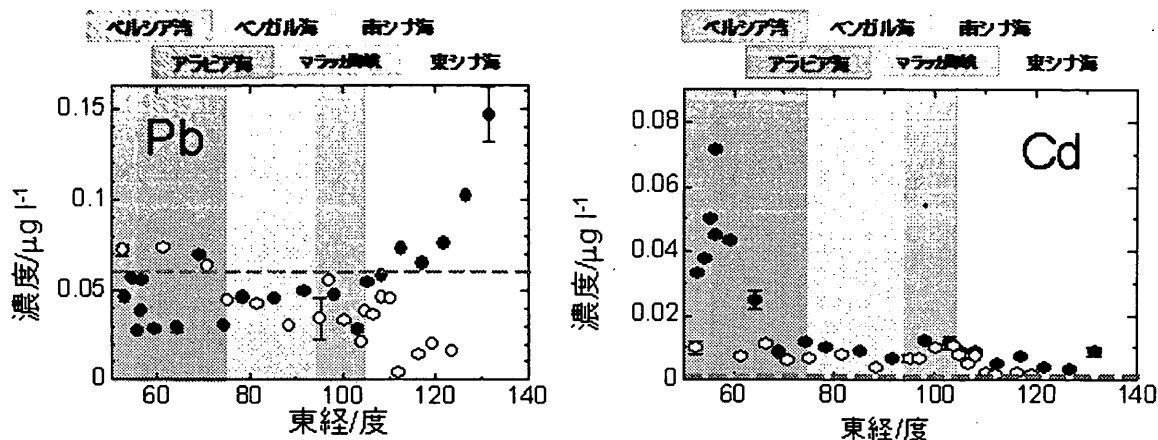


図5 日本ーペルシャ湾航路海水中のPb, Cdの濃度分布

●: 往路、×: 復路、---: 東シナ海における定量値又は文献値

[T. Yabutani et al., Anal. Sci., 17, 399 (2001).]

海域であることから、周辺地域からの人為的汚染も考えられるが、他にタンカーなどの大型船舶の航行が頻繁にあることから、船舶に起因する汚染の可能性も考えられる。一方、Pbの分布は日本近海の東シナ海のデータが比較的高濃度であった。ただし、この結果は往路のみで観測され、復路では高濃度のデータは観測されなかった。微量元素の濃度分布では、Pbと同様に往路、復路のデータが一致しない元素がいくつか存在するため、今後、同海域のモニタリングを高密度に行い、データを蓄積して検討を行う必要がある。

②日本ーペルシャ湾航路各海域における元素濃度の特徴

微量元素の定量結果をもとに、海域ごとの元素濃度の特徴について考察を行った。図6には各海域の定量値の平均値を東シナ海の定量値の平均値で割った規格化値を示した図である。図6では、元素を海洋化学的な分布に基づいて分類して示している。

栄養塩型元素 (Cu,

Zn, 希土類元素など) は栄養塩であるリン酸塩、硝酸塩、ケイ酸塩と類似した分布を示す元素であり、表層では低濃度、有光層 (約200 m) までは深度の増加とともに濃度が増加し、深層ではほ

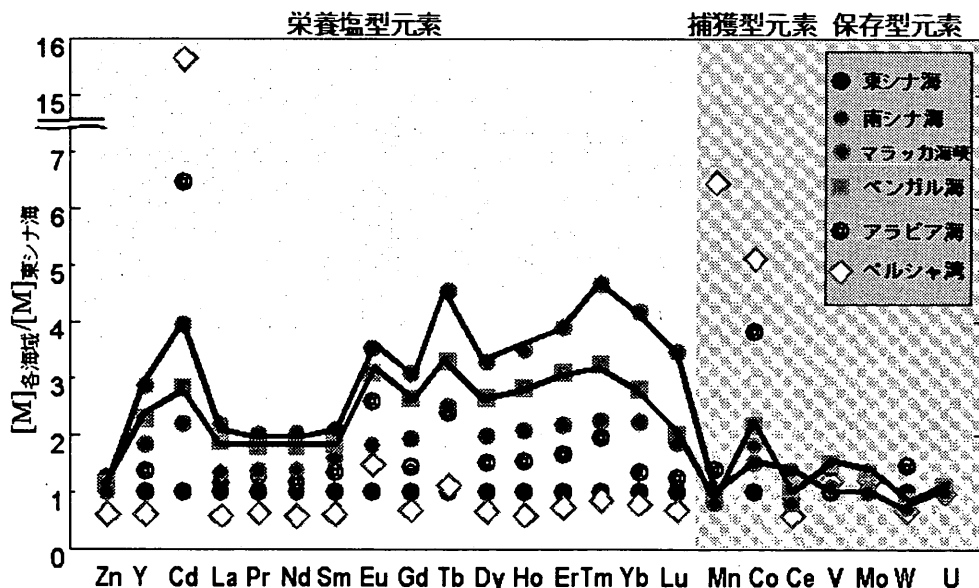


図6 各海域における元素濃度の比較

ば一定の分布を示す。捕獲型元素 (Mn, Co, Ceなど) は深度の増加とともに、粒子に元素が捕獲されて濃度が減少する分布を示し、保存型元素 (V, Mo, W, Vなど) は表層から深層まで、一定の濃度を示す元素である。図6からわかるように、保存型元素及び捕獲型元素はどの海域でもほぼ規格化値が1に近く、海域によらず一定の値を示したが、栄養塩型元素は東シナ海における濃度に比べて、3-4 倍の濃度を示す海域があり、海域によって濃度にかなり違いが見られた。ペルシャ湾やアラビア海付近で

は②で議論したように、Cd, Mn, Coが特異的な挙動を示すが、他の元素は2以下の比較的低い規格化値を示した。また、南シナ海も1-2程度の低い規格化値を示した。これに対して、マラッカ海峡、

ベンガル海では2-4の比較的高い規格化値を示した。マラッカ海峡は、陸からの影響を受けやすいため、河川などを通じて栄養塩型元素が流入したことが考えられるが、ベンガル海は外洋域に位置し、人間活動や陸からの影響は受けにくい。この付近では深層海流がインド大陸付近で湧昇していることが海洋大循環モデルにおいて示唆されている。したがって、栄養塩型元素が高濃度を示すことは深層で高濃度を示す栄養塩型元素が表層付近に湧昇していることを反映した可能性が考えられる。

しかしながら、今回の結果では、多くの微量元素の濃度分布において、同じ海域における往路と復路のデータが一致しなかった。このことは、タンカー航路上の海域では複雑な海流の動きがあり、微量元素濃度が短期間に変動している可能性がある。今後、ひきつづきモニタリングを続け、時間的に高密度な観測を行い、微量元素濃度の変動要因についてさらに検討する必要があると考えられる。

③日本-オーストラリア航路海水中の元素濃度分布

日本-オーストラリア航

表1 オーストラリア航路海水中の主成分元素の定量結果 (単位: mg l^{-1}).

元素	オーストラリア航路			参考値 ^{a)}
	南半球	平均	北太平洋	
Na	10030	10180	10090	10737
Mg	1195	1208	1199	1281
K	431	412	427	408
Ca	388	391	389	412
Sr	6.90	6.95	6.92	7.80

a) 北太平洋における文献値 [野崎義行: 地球化学, 26, 24(1992).]

表2 オーストラリア航路海水中の微量元素の定量結果 (単位: $\mu\text{g l}^{-1}$).

元素	オーストラリア航路			参考値 ^{a)}
	北半球	南半球	平均	
Mo	13.3	13.8	13.5	10.2
Ni	13.6	30.1	19.3	2.9
U	5.54	5.57	5.55	3.37
Zn	2.42	1.30	2.03	8.4
Mn	2.36	4.52	3.11	0.34
Al	1.68	1.32	1.55	2.17
V	1.06	1.02	1.05	1.59
Cu	0.620	0.509	0.582	0.97
W	0.024	0.030	0.026	0.012
Pb	0.0085	0.0066	0.0077	0.063
Cd	0.0058	0.0028	0.0047	0.0052
Y	0.0035	0.0022	0.0031	0.011
La	0.00101	0.00033	0.00077	0.0010
Sm	0.00093	0.00025	0.00068	0.00010
Yb	0.00014	0.00007	0.00012	0.00028

a) 東シナ海における文献値 [T. Yabutani et al, Anal. Sci., 17, 399(2001).]

路海水中の主成分元素の分析結果を表1にまとめる。表1では、分析結果を北半球と南半球の観測点に分けて、それぞれの平均値を示している。両者は、いずれの元素についてもほぼ一致した値を示した。また、全観測点の平均濃度はNa 10100 mg/l, Mg 1200 mg/l, K 427 mg/l, Ca 389 mg/l, Sr 6.92 mg/lであった。北太平洋について報告されている参考値は、Na 10737 mg/l, Mg 1281 mg/l, K 408 mg/l, Ca 412 mg/l, Sr 7.80 mg/lであり、全観測点の平均濃度はこの値とほぼ一致していた。一方、各観測点の濃度分布では、いずれの元素も北緯20-30度付近と南緯10度付近の海域で、他の海域よりも5%程度低い濃度となった。この結果は海流や陸水の混入などの影響による考えられるが、詳細な原因は明らかではない。日本-オーストラリア航路海水中の微量元素の定量結果を表2にまとめる。参考値として、東シナ海の文献値も表2に示す。表2からわかるように、微量元素濃度は、平均値として10 $\mu\text{g/l}$ レベルのモリブデンから0.0001 $\mu\text{g/l}$ レベルの重希土類元素ま

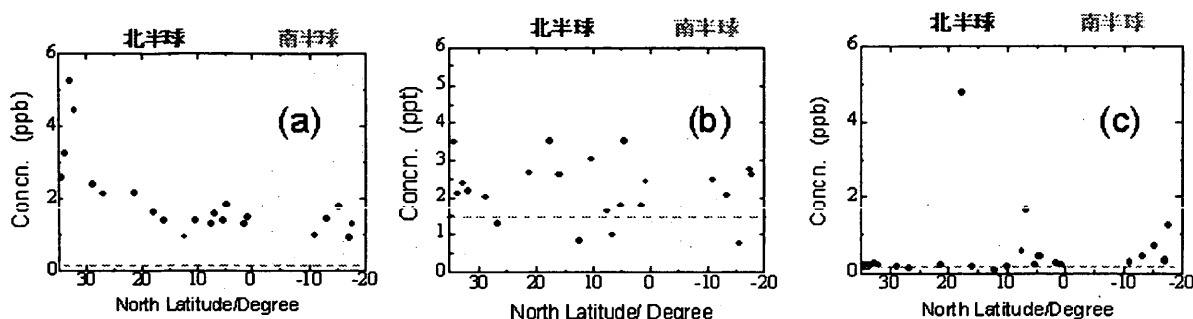


図7 オーストラリア航路海水中微量元素の濃度分布。(a)亜鉛、(b)カドミウム、(c)銅。
[破線は東シナ海における文献値 [T. Yabutani et al, Anal. Sci., 17, 399 (2001)]]

での約30元素の定量値が得られた。昨年度報告したサウジアラビア航路では、東シナ海でほとんどの微量元素が最も低い濃度を示したが、今回分析したオーストラリア航路では、南半球の観測点では、北半球に比べてZn, Cu, Pb, Cd, 希土類元素の濃度が低い傾向を示した。このことは、赤道より南方の太平洋の南西域では、特に人為的影響が小さいことを反映した結果と考えられる。

④日本-オーストラリア航路各海域における元素濃度の特徴

日本-オーストラリア航路海水中の微量元素の特徴的な濃度分布を図7に示す。図7(a)の亜鉛は、日本近海で他の海域に比べて高濃度であった。タングステン、鉛が同様の分布傾向を示した。これらの元素はいずれも工業的利用度が高く、日本国内で大気粉塵や排水などを通じて環境中に放出された後、海洋に運ばれ、海洋中の濃度を上昇させたと考えられる。いずれも環境基準値よりはるかに低濃度であるが、外洋海洋中での存在量は、ppb ($\mu\text{g/l}$)からppt (ng/l)レベルと極微量であるため、人為的な汚染の影響が鋭敏に観測された結果と考えられる。図7(b)のカドミウムは、日本-オーストラリア間でほぼ一定の濃度であった。バナジウム、モリブデン、ウラン、希土類元素が同様の分布傾向を示した。これらの元素の濃度は、文献で報告されている北太平洋の定量値ともほぼ一致するため、今回サンプリングした海域では、外洋海水のバックグラウンド濃度レベルであり、人為的な影響はほとんど受けていないと考えられる。図7(c)の銅は、北緯20度、5度付近の外洋域とオーストラリア近海で他の海域より高濃度を示す元素であり、極めて特異的に濃度上昇が観測された。アルミニウムも同様の分布傾向を示した。まだ一回の分析しか行っていないため、異常点である可能性も否定できないが、今後、モニタリングを繰り返すことにより濃度分布の信頼性を確認し、このような濃度上昇の原因を究明していく必要がある。

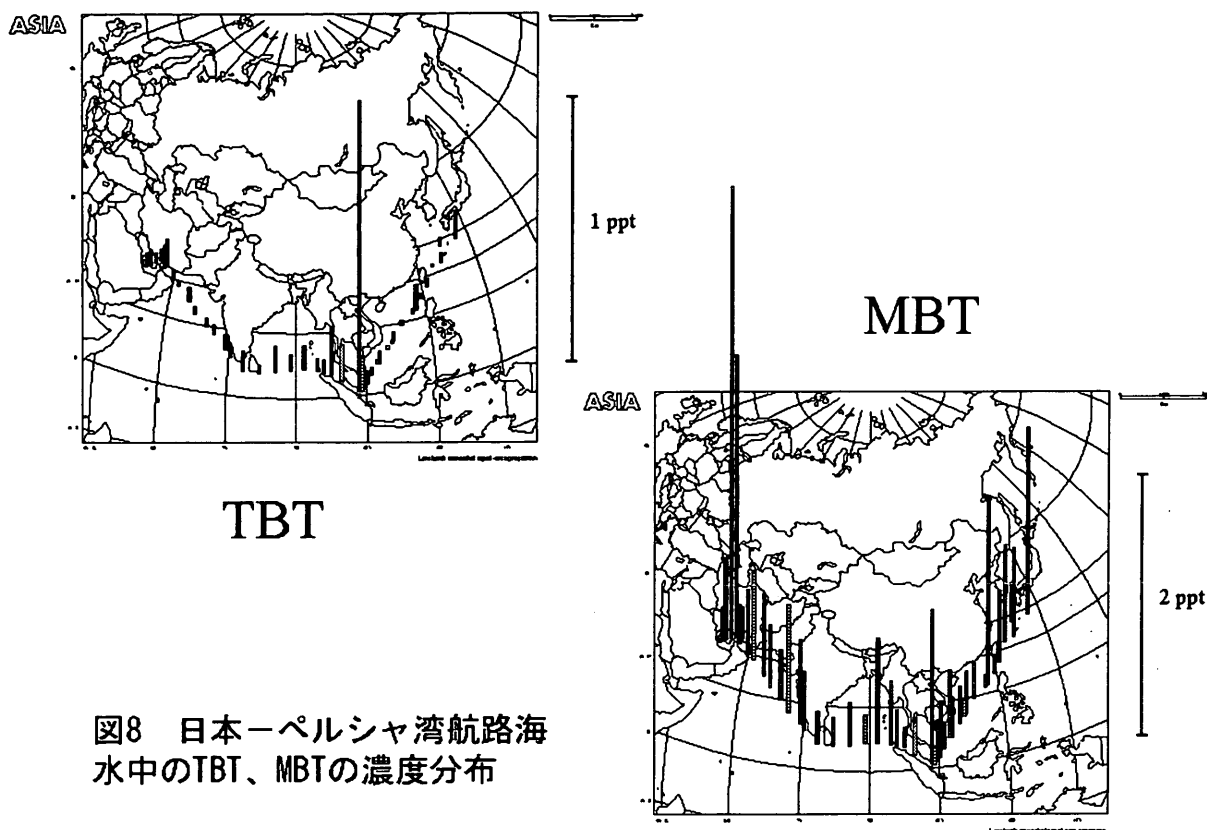


図8 日本－ペルシャ湾航路海水中のTBT、MBTの濃度分布

(4) 有機スズ化合物の濃度分布

① 日本－ペルシャ湾航路上の海水中有機スズ化合物の分布

日本－ペルシャ湾航路で採水された全42点の海水試料を、 NaBEt_4 によるエチル化・ヘキサン抽出/GC/ICP-MSで測定した結果、 $\text{ng/l (ppt)} \sim \text{pg/l (ppq)}$ レベルのトリブチルスズ (TBT)、ジブチルスズ (DBT)、モノブチルスズ (MBT)、無機のスズ、及び一部のオクチル系スズの定量値を得ることができた。トリフェニルスズ (TPhT) などのフェニル系のスズは殆どの海域で検出限界以下であった。試料の保存性等を考慮して、ろ過海水を用いて、すなわち溶存態を測定した。TBTとMBTの定量結果を図8に示す。内分泌攪乱作用のあるTBTは、マラッカ海峡付近で最大約1 pptの高い値を示したが、この濃度は大阪湾とほぼ同じで、巻貝(イボニシ)にインポセックスを誘導するレベルであった。この他、日本近海、ベンガル湾、ペルシャ湾で高濃度が認められた。ペルシャ湾は多くのタンカーが航行しており、かつ閉鎖性が強いためかなりの高濃度が予想されたが、実際には0.1 ppt以下と予想より低い値となった。一方、TBTの分解生成物であるMBT及び無機スズの濃度はペルシャ湾で各々約3 ppt、約14 pptと最大値を示した。この海域は主成分元素濃度の測定結果から分かるように雨量が少なく、強い日射のため、船底から溶出したTBTは短時間に、MBT更には無機スズに分解されていると推測される。また、一方、マラッカ海峡ではMBTは最大でも1 ppt以下であり、TBTの分解速度は熱帯域にもかかわらず比較的遅いことが分かった。この他、日本近海でMBTが高くなる傾向が認められた。また、MBTはほぼ全海域でTBT濃度よりも高いことが明らかとなった。

② 日本－オーストラリア航路上の海水中有機スズ化合物の分布

日本－オーストラリア航路海水中的TBTの定量結果を図9にまとめる。図9から分かるように、TBT濃度は、日本近海で0.053 ngSn/lと最も高く、南半球では約0.01 ngSn/lの低い濃度が観測された。往路と復路でほぼ同様の結果が得られており、赤道より南方の太平洋の南西域では、特に人為的影響が小さいことを反映した結果と考えられる。TBTの他にも、DBTとものオクチルスズ (MOT) で

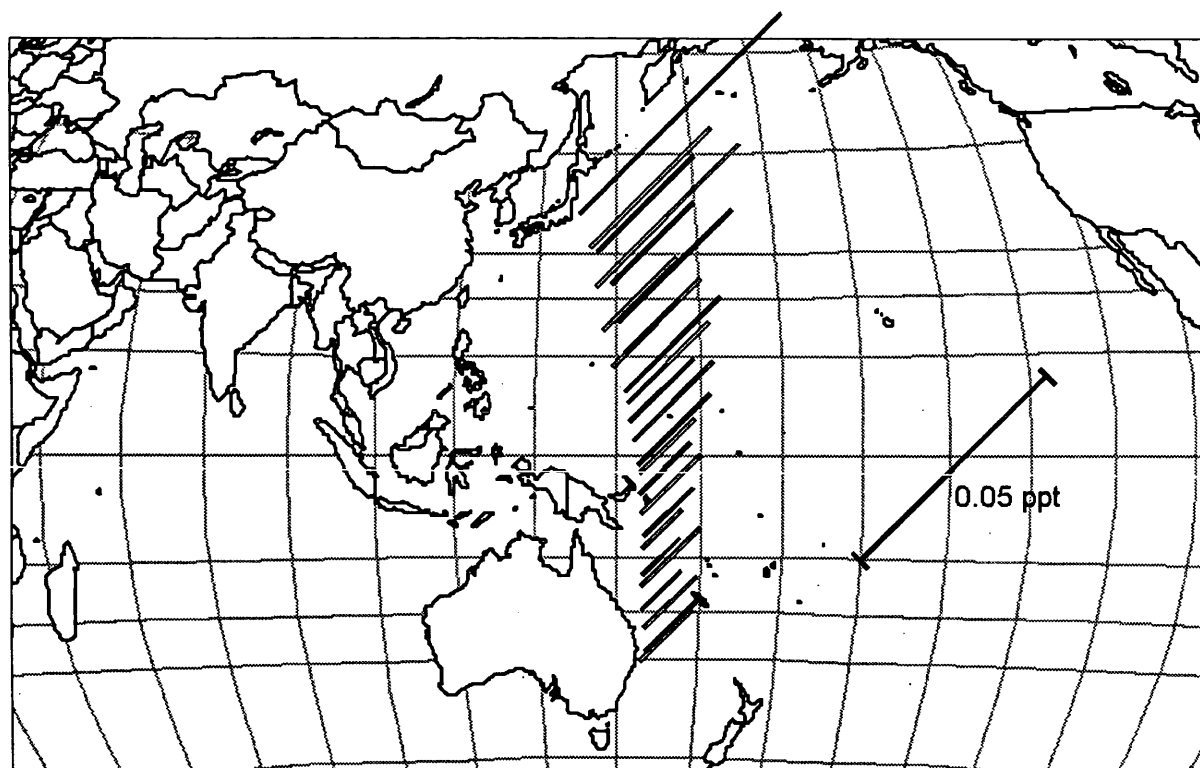


図9 日本－オーストラリア航路海水中のTBT、MBTの濃度分布

同様に南半球で低濃度を示した。MBTに関しては、今回の測定ではブランク値が高く定量下限以下であった。昨年度報告した日本－ペルシャ湾航路に比べ単調な変化であったが、これは昨年度は大陸から近く、かつ船舶の往来が激しい海域であったのに対し、今回の航路は大陸から遠く離れているため、局所的な汚染の影響を受けなかったためであろう。これらの結果有機スズ化合物だけでなく、Zn, Cu, Pb, Cd, 希土類元素の微量重金属類においても同様の傾向を示した。

従来、有機スズによる汚染は、港の近傍に限られた地域汚染と考えられていた。しかし、最近では太平洋に生息するイカや、駿河湾などの深海に生息する深海生物中にもTBTが検出されたことから、地球規模の汚染の進行が懸念されていたが、これまで海水を直接分析した例はなく、本研究で初めて実証的なデータとして地球規模の海洋汚染実態を解明することが可能となった。

(5) 海洋における雌性ホルモン様活性の分布

日本とオーストラリアを往復する石炭運搬船において、冷却水を分岐し、PUFとACFを充填したカラムに300L (通水速度1L/min) 通水したものを冷凍保管した。採水地点及び採水時期は、図10に示した太平洋上の地点 (①～⑧) において、2002年1月から2月にかけて採水した。今回、雌性ホルモン様活性の評価に化学発光強度比を用いた。化学発光強度比とは、ブランク値に対する試料の化学発光強度値である。この値が大きいほど雌性ホルモン様活性が大きいことを示す。-S9試験及び+S9試験の結果を図11に示す。今回、ラット肝S9による代謝反応を行わない試験 (-S9試験)

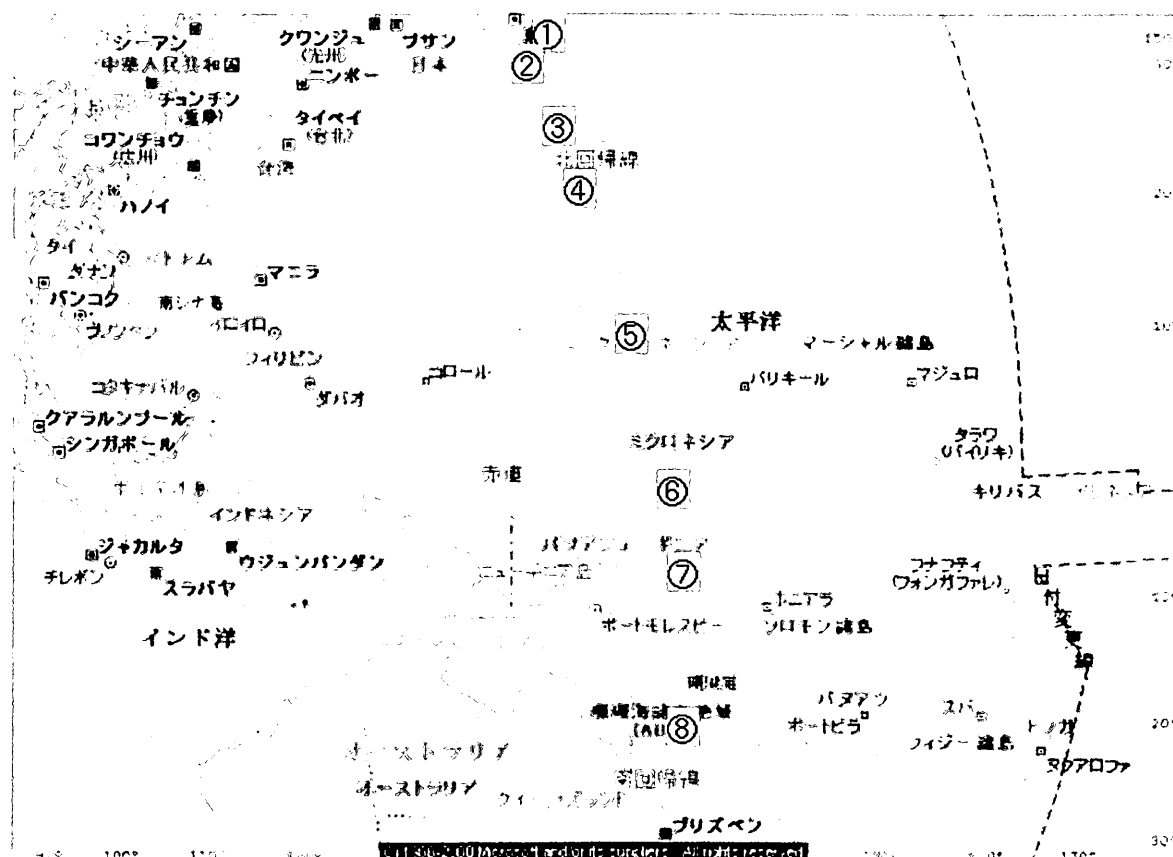


図10 雌性ホルモン様活性測定のための日本ーオーストラリア航路の採取地点

においては、どの地点の試料からも雌性ホルモン様活性がみられなかったのに対し、S9処理を行う試験（+S9試験）では北回帰直線から赤道にかけての3地点（④、⑤、⑥）において雌性ホルモン様活性がみられた。これは、海水中にそのものは雌性ホルモン様活性を示さないが、それが生物に取り込まれて代謝を受けることにより、雌性ホルモン様活性を示す物質が含まれていることを意味しており、海洋生物への影響を考えると興味深いことである。

今後、このデータの信憑性を確かめる上でも更なる調査が必要であり、地球規模での海洋汚染の実態を把握していくことが地球環境を考える上で重要である。

5. 本研究により得られた成果

本研究では、これまで殆ど情報がなかった、外洋域での化学物質の濃度をモニタリングするための方法論を開発し、それを実際の試料を用いて実証した点に大きな価値がある。このため、まず、1) 商船搭載型自動海水採取装置の開発を行った。カラムにより化学物質を濃縮する方法に加えて、海水試料そのものを採取し、冷蔵保存できるシステムは、重金属や有機スズ化合物の正確な定量に有用であった。また、ろ過操作も可能なシステムは、溶存態と懸濁態の分別定量を可能とし、これらの挙動を解明する上で大きな特長である。次に、2) 重金属類の分析方法として、プラズマ分光分析法（ICP-AES）とキレート樹脂濃縮／プラズマ質量分析法（ICP-MS）を用いて海水中の主成分元素から超微量元素までの約40元素の多元素迅速分析法を開発して海洋のグローバルモニタリングを行ない、広域海洋汚染並びに元素循環系に及ぼす人間活動の影響について評価

した。また、3) 有機スズ化合物に関しては、我々が以前に開発した超微量分析法を用いて、外洋域の濃度分布を世界で初めて明らかにした。TBTは2008年に全面使用禁止になることが承認されているが、本研究の成果は全面禁止後の定量結果と比較することにより、その効果を検証するための有力なデータと位置付けられる。最後に、4) 雌性ホルモン様活性物質の測定では、カラム濃縮法とバイオテクノロジーを利用した新しい分析法とを応用することにより、外洋域での雌性ホルモン様活性を初めて測定した。従来、沿岸域で活性は測定されていたが、外洋域では本研究が最初となる。その結果、ラット肝S9による代謝反応を行わない試験(-S9試験)においては、どの地点の試料からも雌性ホルモン様活性がみられなかったのに対し、S9処理を行う試験(+S9試験)では北回帰直線から赤道にかけての3地点において雌性ホルモン様活性がみられた。これは、海水中にそのものは雌性ホル

モン様活性を示さないが、それが生物に取り込まれて代謝を受けることにより、雌性ホルモン様活性を示す物質が含まれていることを意味しており、海洋生物への影響を考えると興味深いことである。今後、このデータの信憑性を確かめる上でも更なる調査が必要であり、地球規模での海洋汚染の実態を把握していくことが地球環境を考える上で重要である。

以上のように、本研究では、極微量の化学物質を高感度に分析する方法を開発し、これまで未解明であった、有機スズ化合物や雌性ホルモン様活性の外洋域における濃度を初めて明らかにし、重金属の海域毎の特徴をモニタリングできることを示したことは、地球規模の海洋汚染観測を行ううえで大きな意義がある。

6. 引用文献

- 1) TR K 007: 2003「工業用水・工場排水中の有機すず化合物測定方法ーガスクロマトグラフィー／誘導結合プラズマ質量法」
- 2) T. Nishihara, J. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S. Hori, and H. Utsumi: "Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay", Journal of Health Science, 46, 4, 282-298(2000).
- 3) F. Shiraishi, H. Shiraishi, J. Nishikawa, T. Noshihara and M. Morita: "Development of a simple operation estrogenicity assay system using the yeast two-hybrid system", Journal of Environmental Chemistry, 10, 1, 57-64(2000).

結果(2万倍濃縮)

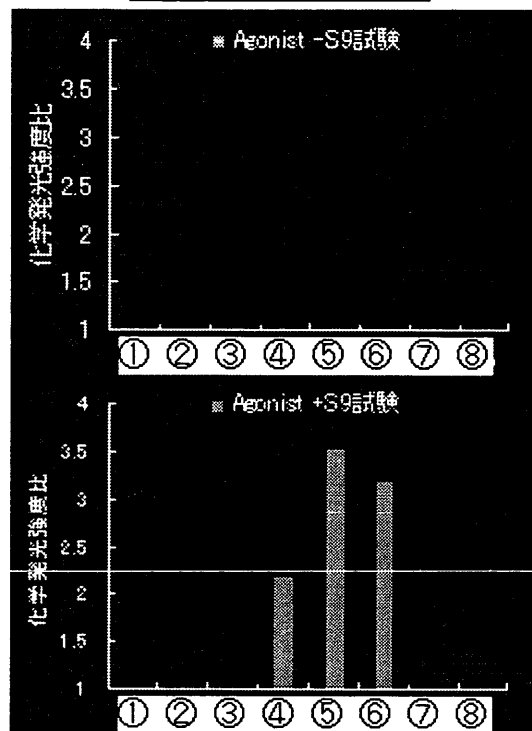


図11 雌性ホルモン様活性の測定結果

7. 国際共同研究等の状況

TBTに関しては、国際海事機構（IMO）において、その使用を禁止する条約（AFS条約）が採択され、防汚塗料の環境影響問題が新たな局面を迎えることとなった。このため、海上技術安全研究所を中心に2004年には船底防汚塗料に関する国際シンポジウムが開催される予定である。本シンポジウムにおいて、従来の方法では、TBTの地球規模の汚染実態を明らかにすることは不可能であり、本海洋観測システムによって初めて可能となった点をアピールし、今後の汚染実態解明や規制遵守状況把握のための基盤研究として、新たな国際共同研究に発展させていきたい。また、POPs条約では有機スズ化合物は含まれていないが、将来含まれる可能性があり、その海洋モニタリングにおいても貢献していく。

8. 研究成果の発表状況

（1）誌上発表（学術誌・書籍）

＜学術誌（査読あり）＞

- ① R. Babu Rajendran, H. Tao, T. Nakazato, and A. Miyazaki: *Analyst*, 125, 1757-1763 (2000), "A quantitative extraction method for the determination of trace amounts of both butyl- and phenyltin compounds in sediments by GC-ICP-MS"
- ② S. Hashimoto, H. Bessho, A. Hara, M. Nakamura, T. Iguchi, and K. Fujita: *Marine Environmental Research*, 49, 37-53 (2000), "Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan"
- ③ T. Yabutani, S. Ji, F. Mouri, A. Itoh, and H. Haraguchi: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 73, 895-901 (2000), "Simultaneous Multielements Determination of Hydride- and Oxoanion-forming Elements in Seawater by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry after Lanthanum Coprecipitation".
- ④ T. Yabutani, F. Mouri, and H. Haraguchi: *Anal. Sci.*, 16, 675-676 (2000), "Concentration Variations of Trace Trace Metals in Surface Seawater along the Ferry Track Between Osaka and Okinawa as Determined by ICP-MS after Chelating Resin Preconcentration".
- ⑤ 原口紘丞, 藪谷智規, 紀 杉, 稲垣和三: *海洋化学研究*, 13(1), 16-29 (2000), 「海水の多元素プロファイリングアナリシス—生物海洋化学的側面から」.
- ⑥ T. Yabutani, K. Chiba, and H. Haraguchi: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 74, 31-38 (2001), "Multielement Determination of Trace Elements in Seawater by ICP-MS after Tandem Preconcentration with Cooperation of Chelating Resin Adsorption and Lanthanum Coprecipitation".
- ⑦ T. Yabutani, F. Mouri, A. Itoh, and H. Haraguchi: *Anal. Sci.*, 17, 399-405 (2001), "Multielement Monitoring for Dissolved and Acid-soluble Concentrations of Trace Metals in Surface Seawater along the Ferry Track between Osaka and Okinawa as Investigated by ICP-MS".

- ⑧ 原口紘丞、長谷川拓也 : Biomed. Res. Trace Elements, 13, 1, 31-45 (2002), 「地球システムの全元素化学と拡張元素」.
- ⑨ S. Hashimoto, T. Yoshimoto, M. Nakao, H. Omura, N. Yamashita, K. Kannan, and J. P. Giesy: Journal of Separation Science, (in press) "An Automated Enantioselective Isolation System for the Study on Estrogenic Potencies: Study of the estrogenic activity of α -hexachlorocyclohexane as example".

<学術誌 (査読なし)>

なし

<書籍>

なし

<報告書類等>

なし

(2) 口頭発表

- ① H. Tao, R. Babu Rajendran, T. Nakazato, and A. Miyazaki : PACIFICHEM2000, Honolulu. USA, 2000. "GC-ICP-MS and LC-ICP-MS for Elemental Speciation"(invited)
- ② 別所宏紀、山下信義、吉元健司、中尾真澄、大村浩、K. Kannan、J. P. Giesy、橋本伸哉 : 日本水産学会(福井)(2000)「ガスクロマトグラフ自動分取装置を用いた α -HCHの光学異性体の分取とその雌性ホルモン様活性に関する研究」
- ③ 長沢泰輔、藪谷智規、伊藤彰英、原口紘き : 日本分析化学会第49回年会 (2000) 「ICP-MS/ICP-AESによる天延水中サブミクロン粒子のキャラクタリゼーション」
- ④ 伊藤彰英、長沢泰輔、原口紘き : 日本分析化学会第49回年会 (2000) 「天然水中溶存高分子有機物-金属錯体のキャラクタリゼーション」
- ⑤ H. Tao, R. Babu Rajendran, T. Nakazato : 2001 FACCS, Michigan. USA, 2001. "GC-ICP-MS for organotin compounds determination in open ocean waters and its application to various oceanic environments"(invited)
- ⑥ 中造真衣子、黒川優子、川合真一郎、橋本伸哉、山田久 : 第7回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会 (2001) 「組み換え酵母による海水及び底泥中のエストロゲン様物質の検索」
- ⑦ 松岡須美子、黒川優子、川合真一郎、橋本伸哉、山田久 : 第7回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会 (2001) 「E-Screenによる水環境中のエストロゲン様物質の検索」
- ⑧ 松岡須美子、黒川優子、川合真一郎、中造真衣子、山田久、藤井一則、大久保進一、松原孝博、西村定一、橋本伸哉、坂本達也 : 日本水産学会 (2002) 「我国沿岸海水および河川水中のエストロゲン様物質の検索 1. E-Screenを用いる方法」
- ⑨ 川合真一郎、黒川優子、松岡須美子、中造真衣子、山田久、藤井一則、大久保進一、松原孝博、西村定一、橋本伸哉、坂本達也 : 日本水産学会 (2002) 「我国沿岸海水および河川水中のエストロゲン様物質の検索 2. 組替え酵母および子宮内膜がん由来細胞を用いる方法」
- ⑩ 原口紘丞 : 第51回日本分析化学会 (2002) 「元素分析と地球環境予測 (特別講演)」

- ⑪ 原口紘丞：第33回中部化学関係学協会支部連合秋季大会（2002）「天然水中微量金属の化学形態別分析と動態（招待講演）」
- ⑫ 田尾博明：平成15年度日本分光学会春季講演会（2003）「複合分析法による環境水中の微量元素のスペシエーション（招待講演）」
- ⑬ 田尾博明：第64回分析化学討論会（2003）「金属の化学種別分析法の開発と環境動態の解明（依頼講演）」

（3）出願特許

なし

（4）受賞等

- ① 日本化学会欧文誌（Bulltein of the Chemical Society of Japan）の2001年（74巻）1号のBCSJ賞受賞，T. Yabutani, K. Chiba, and H. Haraguchi: Bull. Chem. Soc. Jpn., 74, 31-38 (2001). Multielement Determination of Trace Elements in Seawater by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry after Tandem Preconcentration with Cooperation of Chelating Resin Adsorption and Lanthanum Coprecipitation.

（5）一般への公表・報道等

なし

9. 成果の政策的な寄与・貢献について

経済産業省の日本工業標準調査会標準部会環境・資源循環技術専門委員会において、本研究成果である有機スズ化合物の分析方法が標準化情報として承認され、経済産業省の標準化政策に貢献した（TR K 0007:2003）。有機スズの一つであるTBTに関しては、国際海事機構（IMO）において、その使用を禁止する条約（AFS条約）が採択され、防汚塗料の環境影響問題が新たな局面を迎えることとなった。国内ではこの問題に対処するため、日本造船研究協会にRR-E102（TBT分科会）が設けられ、筆者らはその委員となっている。また、2004年には船底防汚塗料に関する国際シンポジウムが開催される予定であり、組織委員会委員となっている。これらの委員会活動を通じて、本研究成果の広報・普及に努めていく。